

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年11月14日 (14.11.2002)

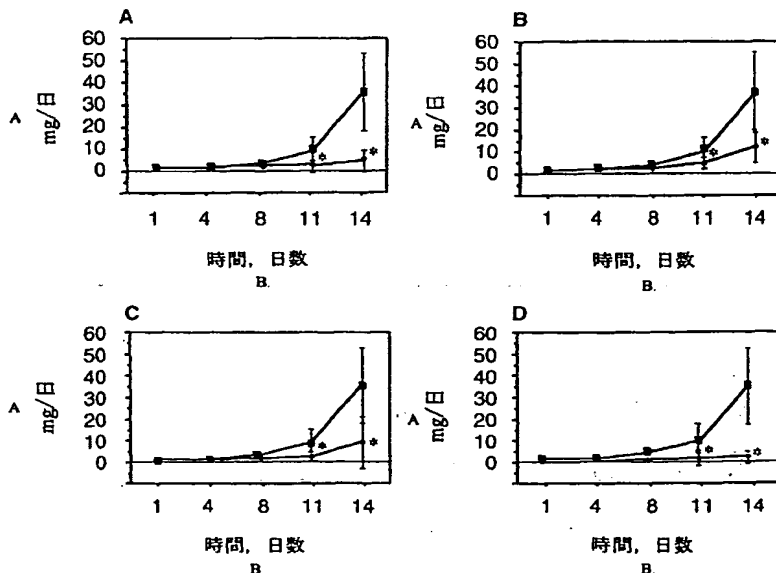
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/089831 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/17, A61P 13/12, 43/00 Jun) [JP/JP]; 〒700-0984 岡山県岡山市桑田町3-11-403 Okayama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09574
- (22) 国際出願日: 2001年10月31日 (31.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-129200 2001年4月26日 (26.04.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 プロテジーン (PROTEGENE INC.) [JP/JP]; 〒153-0065 東京都目黒区中町2-20-3 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 和田 淳 (WADA,
- (74) 代理人: 早川裕司, 外 (HAYAKAWA, Yuji et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座6-10-16 バレ銀座ビル10F アーケイディア特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR NEPHRITIS

(54) 発明の名称: 腎炎の予防・治療剤



A...MG/DAY
B...TIMES, DAYS

(57) Abstract: To provide novel preventives/remedies for nephritis, preventives/remedies for glomerular diseases, inhibitors for infiltration of leucocytes into glomeruli, inhibitors for infiltration of CD8-positive cells into glomeruli and apoptosis inducers for CD8-positive cells, galectin-1, galectin-3 or galectin-8 originating in a mammal such as mouse, rat or humans is employed as the active ingredient of these drugs.

[続葉有]

WO 02/089831 A1



(57) 要約:

新規な腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤、白血球の糸球体内浸潤抑制剤、CD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤およびCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤を提供することを目的とし、これらの有効成分として、マウス、ラット、ヒト等の哺乳動物由来のガレクチン-1、ガレクチン-3またはガレクチン-9を含有せしめる。

明 細 書

腎炎の予防・治療剤

技術分野

本発明は、腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤、白血球またはC D 8 陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤、およびC D 8 陽性細胞のアポトーシス誘導剤に関する。

背景技術

腎臓は生体内の老廃物の除去、水分調節等の重要な役割を担う臓器である。この腎臓に関する疾患として、細菌、ウイルス、化学物質等が原因となって生じる種々の腎炎が知られている。腎炎は、例えば、糸球体病変の種類によって、膜性腎炎、膜性増殖性腎炎、管内増殖性腎炎、メサングウム増殖性腎炎、半月体形成性腎炎、I g A 腎炎、紫斑病性腎炎、ループス腎炎等に分類されており、また、臨床的特徴によって、急性腎炎症候群、急速進行性腎炎症候群、慢性腎炎症候群、ネフローゼ症候群等に分類されている。これらの腎炎の多くは蛋白尿、血尿等の症状を示す。現在、腎炎の治療には、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤等が使用されている。

糸球体腎炎を含む糸球体疾患の中でも、半月体形成性腎炎は急速に進行し強い免疫抑制療法を開始しなければ結果的に腎不全に至る（Yang R-Yら, Biochemistry 37: 4086-4092, 1998; Bolton WK, Semin. Nephrol. 16: 517-526, 1996）。ヒトの半月体形成性腎炎に類似した病変が、抗糸球体基底膜血清（抗G B M 抗体）をW K Y ラットに単回投与することにより惹起される。糸球体病変としては、半月体形成に

加えて、CD 8 陽性細胞やマクロファージの糸球体内への浸潤が認められる (Kawasaki Kら, *Kidney Int.* 41:1517-1526, 1992)。さらに、投与された異種 Ig G 抗体に対する抗体の産生、糸球体における免疫グロブリンおよび補体の沈着により糸球体病変は悪化する。この半月体形成性腎炎は、デキサメタゾンの投与により抑制される。

一方、哺乳類の動物レクチンは糖鎖結合蛋白であり、特異的な糖鎖構造を認識する。動物レクチンは、C 型レクチン、P 型レクチン、penitoxins、ガレクチンの 4 つのグループに分類されている。糖鎖は多くの細胞膜蛋白と細胞外基質の構成成分として重要であり、レクチンとそのリガンドとの間の相互作用は様々な生物学的機能に関与している。

動物レクチンの一種であるガレクチンは、 β -ガラクトシドを特異的に認識し、これに特異的に結合する。現在までに少なくとも 10 種類のガレクチン (ガレクチン-1~10) が同定されクローニングされている (Perillo NLら, *J.Mol.Med.* 76:402-412, 1998; Wada Jら, *J.Biol.Chem.* 272:6078-6086, 1997; Wada Jら, *J.Clin.Invest.* 99:2452-2461, 1997)。これらガレクチンには構造に相同性があり、リガンドの認識にも共通性があるが、生理学的または病理学的にはそれぞれ異なった機能に関与している。これら機能の多様性は、細胞上のリガンドである糖鎖の多様性と、様々な組織における糖鎖の分布に関係している。ガレクチンの様々な機能の中でも、アポトーシスの誘導や免疫反応における役割について多くの報告がある。例えば、ガレクチン-1 は実験的な自己免疫疾患を改善し (Levi Gら, *Eur.J.Immunol.* 13:500-507, 1983; Offner Hら, *Neuroimmunology* 28:177-184, 1990)、活性化されたヒト末梢 T 細胞や単離されたヒト胸腺細胞のアポトーシスを誘導する (Perillo NLら, *Nature* 378:736-739, 1995; P

erillo NLら, J.Exp.Med 185 : 1851-1858, 1997) 。胸腺で強く発現しているガレクチン-9 も胸腺細胞のアポトーシスを誘導する (Wada Jら, J.Clin.Invest. 99 : 2452-2461, 1997) 。逆に、ガレクチン-3 はT細胞を保護するように働き、細胞質でbcl-2とヘテロダイマーを形成することによりアポトーシスを阻止する (Yang R-Yら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93 : 6737-6742, 1996) 。

発明の開示

本発明は、新規な腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤、白血球の糸球体内浸潤抑制剤、CD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤およびCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明により提供される腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤および白血球の糸球体内浸潤抑制剤は、以下の(a)または(b)に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする。

(a) 配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

また、本発明により提供されるCD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤およびCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤は、以下の(c)または(d)に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする。

- (c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (d) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

図面の簡単な説明

図 1 は、ガレクチン遺伝子ファミリーのタイプを示す模式図である。

図 2 は、NTS 腎炎ラットにおける尿蛋白排出量を示す図である。

図 3 は、NTS 腎炎ラットの腎臓標本の光学顕微鏡および免疫蛍光顕微鏡による検査結果を示す図である。

図 4 は、糸球体内へ浸潤した細胞の定量結果を示す図である。

図 5 は、NTS 腎炎ラットの腎臓標本の免疫蛍光顕微鏡による検査結果 (A) および糸球体内における増殖細胞の定量結果 (B) を示す図である。

図 6 は、ELISA による末梢血抗ウサギ IgG 抗体レベルの測定結果を示す図である。

図 7 は、腎臓組織の in situ TUNEL アッセイの結果を示す図である。

図 8 は、脾臓から単離した T 細胞のアポトーシスアッセイの結果を示す図である。

図 9 は、投与された外因性 G9 の腎組織における分布を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤および白

血球の糸球体内浸潤抑制剤は、以下の（a）または（b）に示すポリペプチドを有効成分として含有し、本発明のCD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤およびCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤は、以下の（c）または（d）に示すポリペプチドを有効成分として含有する。

（a）配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下「ポリペプチド（a）」という場合がある。）

（b）配列番号1～3のいずれかに記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド（以下「ポリペプチド（b）」という場合がある。）

（c）配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド（以下「ポリペプチド（c）」という場合がある。）

（d）配列番号3に記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド（以下「ポリペプチド（d）」という場合がある。）

配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、マウス由来のガレクチン-1であり、配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、マウス由来のガレクチン-3であり、配列番号3記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、マウス由来のガレクチン-9である。

ガレクチンは、β-ガラクトシドに特異的な結合活性を有するタンパク質および糖タンパク質の総称である。そのうち、ガレクチン-1は、1本のポリペプチド鎖からなる糖鎖結合ドメイン（約14kDのサブユニット）のホモダイマー（プロトタイプ）として存在しており（図1参照）、このタイプに属する他のガレクチンとしては、ガレクチン

ー 2、ガレクチンー 5、ガレクチンー 7、ガレクチンー 10 等が挙げられる。また、ガレクチンー 3 は、C 末端に 1 つの糖鎖結合ドメイン、N 末端に hnRNP 様ドメインを有するキメラタイプとして存在している（図 1 参照）。また、ガレクチンー 9 は、同一のペプチド鎖に 2 つの糖鎖結合ドメインを有するタンデムリピートタイプ（直列反復型）として存在しており（図 1 参照）、このタイプに属する他のガレクチンとしては、ガレクチンー 4、ガレクチンー 6、ガレクチンー 8、ガレクチンー 9 等が挙げられる。ガレクチンー 9 等のタンデムリピートタイプのガレクチンにおける 2 つの糖鎖結合ドメインは同一ではなく、アミノ酸レベルで約 38% の相同性を有している。

また、いずれのガレクチンも、糖鎖結合ドメインのアミノ酸配列は全長にわたって保存されている。糖鎖結合ドメインは、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいては 1～135 番目のアミノ酸残基からなる部分（すなわち配列番号 1 記載のアミノ酸配列の全体）、配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいては 130～262 番目のアミノ酸残基からなる部分、配列番号 3 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドにおいては 15～146 番目または 192～322 番目のアミノ酸残基からなる部分と考えられている。特に、配列番号 1 記載のアミノ酸配列のうち、30～90 番目のアミノ酸残基からなる部分が β -ガラクトシドへの結合活性に関与していると考えられており、この部分は各ガレクチンにおいてよく保存されている。

ポリペプチド（a）または（c）において欠失、置換または付加されるアミノ酸の個数は、ポリペプチドが β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有する限り特に限定されるものではなく、その個数は 1 又は複数個、好ましくは 1 又は数個であり、その具体的な範囲は、好ま

しくは1～25個、さらに好ましくは1～10個である。このとき、ポリペプチド(b)のアミノ酸配列は、ポリペプチド(a)のアミノ酸配列と少なくとも25%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上の相同性を有し、ポリペプチド(d)のアミノ酸配列は、ポリペプチド(c)のアミノ酸配列と少なくとも25%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上の相同性を有する。

また、ポリペプチド(a)または(c)において欠失、置換または付加されるアミノ酸の位置は、ポリペプチドが β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有する限り特に限定されるものではない。ポリペプチド(a)または(c)において欠失、置換または付加されるアミノ酸の位置としては、例えば、糖鎖結合ドメイン以外の部分が考えられる。

ここで、「 β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有する」とは、 β -ガラクトシド(例えばラクトース(グルコース- β -D-ガラクトシド))に対する結合活性は有するが、 β -ガラクトシド以外の糖鎖構造に対する結合活性は有しないことを意味する。 β -ガラクトシド以外の糖鎖構造としては、例えば、グルコース- α 1,4-グルコース、グルコース- α 1,2-フルクトース等が挙げられる。なお、「ガラクトシド」は、ガラクトースのヘミアセタール水酸基が他の化合物とエーテル結合したものの総称であり、その具体例としては、ラクトースやメリビオースなどの少糖類の他、ガラクトースを含む配糖体や糖脂質などが挙げられる。ガラクトシドは、その結合配位によって α 型と β 型とに分けられ、このうち「 β -ガラクトシド」は β 型のものである。

配列番号1記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸配列が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプ

チドは、 β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するとともに、ガレクチン-1と同様の構造をとり得ること、すなわち、1本のポリペプチド鎖からなる糖鎖結合ドメインのホモダイマーを形成し得ることが好ましく、ガレクチン-1と同様の生物学的機能を有していることがさらに好ましい。ガレクチン-1の生物学的機能としては、例えば、細胞接着、細胞増殖、胸腺細胞や末梢活性化T細胞のアポトーシスの制御等が挙げられる。

配列番号2記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸配列が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、 β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するとともに、ガレクチン-3と同様の構造をとり得ること、すなわち、C末端に1つの糖鎖結合ドメイン、N末端にhnRNP様ドメインを有することが好ましく、ガレクチン-3と同様の生物学的機能を有していることがさらに好ましい。ガレクチン-3の生物学的機能としては、例えば、細胞接着、炎症（単球でのIL-1産生や好中球からの活性酸素の産生を促進する）、mRNAのスプライシング、ヒトT細胞白血病セルライン（Jurkat E6-1）のアポトーシス抑制作用等が挙げられる。

配列番号3記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸配列が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、 β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するとともに、ガレクチン-9と同様の構造をとり得ること、すなわち、同一のペプチド鎖に2つの糖鎖結合ドメインを有することが好ましく、ガレクチン-9と同様の生物学的機能を有していることがさらに好ましい。ガレクチン-9の生物学的機能としては、例えば、好酸球走化能、胸腺細胞の分化と胸腺細胞のアポトーシスの誘導、末梢活性化T細胞のアポトーシス誘導等が挙げられる。

配列番号 1、2 または 3 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチドには、マウス由来のガレクチン-1、ガレクチン-3 またはガレクチン-9 に対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したポリペプチドの他、欠失、置換または付加された状態で天然に存在するポリペプチド、例えば、ヒト、ラット等の哺乳動物由来のガレクチン-1、ガレクチン-3 またはガレクチン-9 や、これらのガレクチンに対して人為的に欠失、置換、付加等の変異を導入したポリペプチドも含まれる。

ヒト由来のガレクチン-1、3、9 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 に示す。また、ラット由来のガレクチン-1、3、9 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 に示す。

本発明において、「ポリペプチド」には、糖鎖が付加されたポリペプチドおよび糖鎖が付加されていないポリペプチドのいずれもが含まれる。ポリペプチドに付加される糖鎖の種類、位置等は、ポリペプチドの製造の際に使用される宿主細胞の種類によって異なるが、糖鎖が付加されたポリペプチドには、いずれの宿主細胞を用いて得られるポリペプチドも含まれる。また、「ポリペプチド」には、その医薬的に許容される塩も含まれる。

ポリペプチド (a)、(b)、(c) および (d) は、それぞれのポリペプチドをコードする DNA を用いて常法に従って製造できる。例えば、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、それぞれ配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 に記載の塩基配列からなる DNA を用いて製造

できる。

ポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA は、例えば、以下の (1) ~ (3) に従って取得できる。

(1) cDNAライブラリーの作製

マウス由来 mRNA を常法に従って調製する。例えば、マウスの胎児腎臓の組織または細胞を、グアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全 RNA を得た後、オリゴ d T-セルロースやセファロース 2 B を担体とするポリ U-セファロース等を用いたアフィニティークラム法、バッチ法等によりポリ (A+) RNA (mRNA) を得る。得られた mRNA を鋳型として、オリゴ d T プライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖 cDNA を合成した後、該一本鎖 cDNA から二本鎖 cDNA を合成する。このようにして得られた二本鎖 cDNA を適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。得られた組換えベクターを用いて大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択することにより、cDNA のライブラリーが得られる。

ここで、cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターは、宿主細胞中で自立複製できるものであればよく、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター等を使用できる。宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等を使用できる。

大腸菌等の宿主細胞の形質転換は、Hanahan の方法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166: 557-580 (1983))、すなわち、塩化カルシウム、塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、組換えベクターを加える方法等により行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合は、テトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含むしておく。

cDNAライブラリーの作製は、市販のキット、例えば、SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Gibco BRL社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (ストラタジーン社製)等を使用して行なうことができる。

(2) 目的のDNAを含むクローンのスクリーニング

既知のガレクチンのアミノ酸配列に基づいてプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行ない、PCR増幅断片を得る。PCR増幅断片は、適当なプラスミドベクターを用いてサブクローニングしてもよい。

PCRに使用するプライマーとしては、配列番号10記載の塩基配列からなるDNAに対しては、例えば、5'-gcttcaatcatggcctgt-3' (センスプライマー)、5'-ggctggcttcactcaaaggc-3' (アンチセンスプライマー)、配列番号11記載の塩基配列からなるDNAに対しては、例えば、5'-gcacagagagcataccag-3' (センスプライマー)、5'-cttctggcttagatcatg-3' (アンチセンスプライマー)、配列番号12記載の塩基配列からなるDNAに対しては、例えば、5'-gcattgggtccctgagatag-3' (センスプライマー)、5'-cgttccagagaccggatcc-3' (アンチセンスプライマー)を使用できる。

cDNAライブラリーに対して、PCR増幅断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のDNAを取得できる。プローブとしては、PCR増幅断片をアイソトープ(例えば ^{32}P 、 ^{35}S)、ビオチン、ジゴキシゲニン等で標識したものを使用できる。

目的のDNAを含むクローンは、抗体を用いたイムノスクリーニング等の発現スクリーニングによっても得ることができる。

(3) 塩基配列の決定

取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのまま、または適当な制限酵素等で切断した後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、マキシムーギルバートの化学修飾法、ジデオキシヌクレオチド鎖終結法を使用して決定できるが、通常は、373A DNAシーケンサー（Perkin Elmer社製）等の塩基配列分析装置を使用して配列決定される。

以上のようにして、ポリペプチド（a）をコードするDNA（具体的には、配列番号10、配列番号11または配列番号12に記載の塩基配列からなるDNA）、およびポリペプチド（c）をコードするDNA（具体的には、配列番号12に記載の塩基配列からなるDNA）を取得できる。

ポリペプチド（a）をコードするDNAは、配列番号10、配列番号11および配列番号12に記載の塩基配列からなるDNAに限定されるものではなく、ポリペプチド（a）をコードする限り、その他の塩基配列からなるDNAも含まれる。ポリペプチド（c）をコードするDNAについても同様である。そのようなDNAは、その塩基配列に従って化学合成により取得することができる。DNAの化学合成は、市販のDNA合成機、例えば、チオホスファイト法を利用したDNA合成機（島津製作所社製）、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機（パーキン・エルマー社製）を使用して行なうことができる。

ポリペプチド（b）または（d）をコードするDNAは、例えば、マウス、ラット、ヒト等の哺乳動物由来のcDNAライブラリーから、それぞれポリペプチド（a）または（c）をコードするDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAをスクリーニングすることにより取得できる。

「ポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、ポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA をプローブとしたコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンハイブリダイゼーション法等により得られる DNA を意味し、例えば、コロニーまたはプラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いてハイブリダイゼーションを行った後、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 42°C の条件下、好ましくは $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 42°C の条件下、さらに好ましくは $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 42°C の条件下でフィルターを洗浄することにより取得できる DNA が含まれる。

ポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA の具体例としては、それぞれポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA と少なくとも 40% 以上の相同性を有する DNA、好ましくは 60% 以上の相同性を有する DNA、さらに好ましくは 80% 以上の相同性を有する DNA が挙げられる。

また、ポリペプチド (b) または (d) をコードする DNA は、それぞれポリペプチド (a) または (c) をコードする DNA に、例えば部位特異的変異誘発法によって人為的に変異を導入することにより取得できる。変異の導入は、例えば、変異導入用キット、例えば、Mutant-K (TAKARA 社製)、Mutant-G (TAKARA 社製)、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを使用して行なうことができる。また、塩基配列が既に決定されている DNA については、上記のように化学合成により取得することもできる。

ポリペプチド (a)、(b)、(c) および (d) は、例えば、以下の (1) ~ (3) に従って、それぞれのポリペプチドをコードする

DNAを宿主細胞中で発現させることにより製造できる。

(1) 組換えベクターおよび形質転換体の作製

目的とするポリペプチドのコード領域を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、目的とするポリペプチドのコード領域の塩基配列を、宿主細胞における発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換したDNAを調製する。

上記DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより組換えベクターを作製し、該組換えベクターを適当な宿主細胞に導入することにより、目的とするポリペプチドを生産し得る形質転換体を取得できる。

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現し得る限り、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等のいずれを使用してもよい。また、動物個体や植物個体を使用することもできる。

発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製が可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター等を使用できる。発現ベクターの具体例としては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（ペーリンガー・マンハイム社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pBluescript II SK+（ストラタジーン社製）、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pETシステム（ノバジェン社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社製）、pMAL-c2（New England Biolabs社製）、pSTV28（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）等が挙げられる。

細菌を宿主細胞とする場合、例えば、エッシャー・コリ（*Escherichia coli*）等のエッシャー属、バチルス・ズブチリス（*Bacillus*

us subtilis) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (Rhizobium meliloti) 等のリゾビウム属に属する細菌を宿主細胞として使用できる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli K12、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101等の大腸菌や、Bacillus subtilis MI 114、Bacillus subtilis 207-21等の枯草菌を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、大腸菌等の細菌中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを使用できる。また、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターを使用することもできる。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69 : 2110-2114 (1972))、エレクトロポレーション法等を使用できる。

酵母を宿主細胞とする場合、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンペ (Schizosaccharomyces pombe)、ピヒア・パストリス (Pichia pastoris) 等を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等を使用できる。

酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法（Becker, D.M. et al., Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990)）、スフェロプラスト法（Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978)）、酢酸リチウム法（Itoh, H., J. Bacteriol., 153: 163-168 (1983)）等を使用できる。

動物細胞を宿主細胞とする場合、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等を宿主細胞として使用できる。この場合のプロモーターは、動物細胞中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTR(Long Terminal Repeat)プロモーター、CMVプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を使用できる。

動物細胞への組換えベクターの導入方法は、動物細胞にDNAを導入し得る方法であれば特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を使用できる。

昆虫細胞を宿主とする場合には、*Spodoptera frugiperda*の卵巢細胞、*Trichoplusia ni*の卵巢細胞、カイコ卵巢由来の培養細胞等を宿主細胞として使用できる。*Spodoptera frugiperda*の卵巢細胞としてはSf9、Sf21等、*Trichoplusia ni*の卵巢細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巢由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等が挙げられる。

昆虫細胞への組換えベクターの導入方法は、昆虫細胞にDNAを導入し得る限り特に限定されず、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を使用できる。

（２）形質転換体の培養

目的とするポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを導入した形質転換体を通常の培養方法に従って培養する。

形質転換体の培養は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌や酵母等の微生物を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行なえる培地であれば天然培地、合成培地のいずれを使用してもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を使用できる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸または有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物等を使用できる。無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を使用できる。

形質転換体の培養は、振盪培養または通気攪拌培養等の好氣的条件下で行なう。培養温度は通常37～39℃、培養時間は通常8～12時間であり、培養期間中はpHを7.2～7.4に保持する。pHの調整は、無機酸、有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を使用して行なうことができる。また、培養の際、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデュー

サーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、EagleのMEM培地、DMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を使用できる。形質転換体の培養は、通常5%CO₂存在下、37~42℃で2~4日間行なう。また、培養の際、必要に応じてカナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーミンジェン社製）、Sf-900 II SFM培地（Gibco BRL社製）、ExCell400、ExCell405（JR Hバイオサイエンス社製）等を使用できる形質転換体の培養は、通常27℃で12~24時間行なう。また、培養の際、必要に応じてゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

目的とするポリペプチドは、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン等が挙げられる。

(3) ポリペプチドの単離・精製

形質転換体の培養物より目的とするポリペプチドを採取することにより、目的とするポリペプチドが得られる。ここで、「培養物」には、培養上清、培養細胞、培養菌体、細胞または菌体の破碎物のいずれもが含まれる。

目的とするポリペプチドが形質転換体の細胞内に蓄積される場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に細胞を破碎して、目的とするポリペプチドを抽出する。

また、目的とするポリペプチドが形質転換体の細胞外に分泌される場合には、培養上清をそのまま使用するか、遠心分離等により培養上清から細胞または菌体を除去する。

こうして得られるポリペプチド (a)、(b)、(c) または (d) は、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、ゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精製できる。

また、ポリペプチド (a)、(b)、(c) または (d) は、そのアミノ酸配列に基づいて、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によって製造することもできる。この際、市販のペプチド合成機を利用できる。

ポリペプチド (a) または (b) は、腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤または白血球の糸球体内浸潤抑制剤として単独で投与することも可能ではあるが、通常は医薬的に許容され得る 1 種以上の担体および／または添加剤とともに常法に従って製剤化して使

用する。また、ポリペプチド（c）または（d）も同様に、CD 8 陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤またはCD 8 陽性細胞のアポトーシス誘導剤として単独で投与することも可能ではあるが、通常は医薬的に許容され得る1種以上の担体および／または添加剤とともに常法に従って製剤化して使用する。製剤化する場合、製剤中の有効成分の量は、通常0.1～5重量%、好ましくは1～5重量%程度である。

医薬的に許容される担体としては、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。

製剤化に際して使用される添加剤としては、例えば、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、賦形剤、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等が挙げられ、これらの添加剤は製剤の投与単位形態等に応じて適宜選択される。これらのうち、通常の蛋白製剤等に使用される成分、例えば、安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等が好ましく選択される。

添加剤の具体例を以下に例示する。

安定化剤：ヒト血清アルブミン；グリシン、システイン、グルタミン酸等のL-アミノ酸；グルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒ

ドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類及びそれらの誘導体等の糖類；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース誘導体等。

界面活性剤：ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等の界面活性剤。

緩衝剤：ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸およびそれらの塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）。

等張化剤：塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等。

キレート剤：エデト酸ナトリウム、クエン酸等。

本発明の腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤または白血球の糸球体内浸潤抑制剤は、ポリペプチド（a）または（b）のいずれか一方を有効成分として含有していてもよいし、両方を有効成分として含有していてもよい。また、本発明のCD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤またはCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤も同様に、ポリペプチド（c）または（d）のいずれか一方を有効成分として含有していてもよいし、両方を有効成分として含有していてもよい。

ポリペプチド（a）、（b）、（c）または（d）は、その医薬的に許容される塩であってもよく、その具体例としては、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウム等の無毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられる。また、上記塩には、ポリペプチドと適当な有機

酸または無機酸との反応による無毒性酸付加塩も含まれる。代表的無毒性酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、酢酸塩、蔞酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、p-トールエンスルホン酸塩（トシレート）、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等が挙げられる。

投与経路および投与剤形は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましい。投与経路としては、例えば、経口投与、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与が挙げられ、投与剤形としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等が挙げられる。

経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。乳剤やシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として使用して製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として使用して製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤、噴霧剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液またはこれらの混合物を担体として使用して製造できる。座剤は、力カオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等を担体として使用して製造できる。噴霧剤は、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体として、乳糖、グリセリン等を使用して製造でき、エアロゾル、ドライパウダー等に製剤化できる。

投与量および投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、投与量は、成人1日当たり通常0.01～1 mg/kgの範囲から適宜選択でき、投与回数は、1日1回から数回の範囲から適宜選択できる。

本発明の腎炎の予防・治療剤は、腎炎を予防および／または治療できる。予防・治療の対象となる腎炎の種類は特に限定されるものではないが、蛋白尿等の症状や、糸球体肥大、糸球体内の細胞過多、半月体形成、白血球の糸球体内浸潤、CD8陽性細胞の糸球体内浸潤およびフィブリノーゲンの糸球体内沈着等の糸球体病変を伴う腎炎に好適に使用できる。このような腎炎としては、糸球体腎炎、例えば、半月体形成性腎炎、ループス腎炎、IgA腎症、膜性増殖性糸球体腎炎等が挙げられる。

本発明の糸球体疾患の予防・治療剤は、糸球体疾患を予防および／または治療できる。予防・治療の対象となる糸球体疾患の種類は特に限定されるものではないが、糸球体肥大、糸球体内の細胞過多、半月体形成、白血球の糸球体内浸潤、CD8陽性細胞の糸球体内浸潤およびフィブリノーゲンの糸球体内沈着等の病変を示す糸球体疾患に好適に使用できる。このような糸球体疾患としては、糸球体腎炎、例え

ば、半月体形成性腎炎、ループス腎炎、IgA腎症、膜性増殖性糸球体腎炎等が挙げられる。

本発明の白血球の糸球体内浸潤抑制剤は、白血球の糸球体内への浸潤を抑制または阻害できる。糸球体内浸潤抑制の対象となる白血球としては、例えば、単球、マクロファージ、T細胞、ナチュラルキラー細胞等が挙げられるが、特にマクロファージの糸球体内への浸潤を抑制するために好適に使用できる。白血球の糸球体内への浸潤を抑制または阻害することにより、白血球の糸球体内浸潤が原因となる疾患、例えば、糸球体腎炎（例えば半月体形成性腎炎）等の糸球体疾患を予防および／または治療できる。

本発明のCD8陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤は、CD8陽性細胞の糸球体内への浸潤を抑制または阻害できる。糸球体内浸潤抑制の対象となるCD8陽性細胞の種類は特に限定されるものではないが、例えば、CD8陽性細胞障害性T細胞等が挙げられる。CD8陽性細胞の糸球体内への浸潤を抑制または阻害することにより、CD8陽性細胞の糸球体内浸潤が原因となる疾患、例えば、糸球体腎炎（例えば半月体形成性腎炎）等の糸球体疾患を予防および／または治療できる。

本発明のCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤は、CD4陽性細胞にアポトーシスを誘導することなく、CD8陽性細胞に選択的にアポトーシスを誘導できる。アポトーシス誘導の対象となるCD8陽性細胞の種類は特に限定されるものではないが、例えば、CD8陽性細胞障害性T細胞等が挙げられる。CD8陽性細胞のアポトーシスを誘導することにより、CD8陽性細胞が原因となる疾患、例えば、糸球体腎炎（例えば半月体形成性腎炎）等の糸球体疾患を予防および／または治療できる。

〔実施例〕

1. 方 法

(1) ウサギ抗糸球体基底膜血清 (nephrotoxic serum: NTS) の作製

4週齢の雌WKYラット（体重約100g）より糸球体基底膜（GBMs）を分離して、抗糸球体基底膜抗体の抗原として使用した。なお、使用したWKYラットは、Charles River Japan (Atsugi, Kanagawa, Japan) から購入した。

WKYラットの腎臓を生理食塩水で灌流した後、それらをホモゲナイズし、糸球体基底膜を単離した。ホモゲネートとFreund完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) とを等量混和してエマルジョンを調製し、このエマルジョンを月に2回ずつ2ヶ月間ウサギに皮下注射により投与した。最後の投与から3週間後にウサギより採血し、抗血清を分離した。この抗血清を56℃で30分間非動化し、新鮮な赤血球で吸着した後、WKYラットに腎炎を誘導するのに使用した。

(2) マウスガレクチン-1, -3, -9組換えタンパク質の作製

組換えガレクチン-1, -3, -9（以下、G1, G3, G9という。）は、公知の方法（Wada J.ら, J.Biol.Chem. 272: 6078-6086, 1997; Wada J.ら, J.Clin.Invest 99: 2452-2461, 1997）に基づいて、pTrcHis2ベクター（Invitrogen, San Diego, CA, USA）を使用して産生させた。なお、これらの組換えタンパク質は、C末端にc-mycエピトープと(His)₆をもつ融合タンパク質として産生される。

G1遺伝子（配列番号10）、G3遺伝子（配列番号11）、G9遺伝子（配列番号12）を含むベクター（以下、それぞれ「pTrcHis2

/G1」、「pTrcHis2/G3」、「pTrcHis2/G9」という。)を、TOP10バクテリア宿主 (Invitrogen) にトランスフォーメーションした。トランスフォーメーションした細菌コロニーを、Luria-Bertani's 培地で培養し、1 mmol/Lのisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加えることによりタンパク質合成を誘導した。1 % TritonX-100、10mmol/L benzamidine、10mmol/L ϵ -amino-n-caproic acid、および2 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluorideを含むTris-dithiothreitol (Tris-DTT) 緩衝液 (20mmol/L Tris (pH 7.4) , 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , 150mmol/L sodium chloride , 1 mmol/L DTT) で細菌を溶解した。その溶解液を4℃で30分間、20 000 \times gで遠心した。遠心上清を10mLのlactosyl-Sepharoseカラム (Sigma, ST.Louis, MO, USA) に添加した。非結合タンパク質を洗浄した後、融合タンパク質を200mmol/L Lactoseを含むTris-DTTバッファーで溶出した。その溶出画分を1 mmol/L DTTを含有するリン酸緩衝液 (PBS) で透析し、-70℃で保存した。サンプルを12.5%のSDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) で解析したところ、いずれのガレクチンでも単一のバンドが得られ、分子量も一致した。すなわち、分子量はG 1が17kDa、G 3が37kDa、G 9が39kDaであり、それぞれ構成アミノ酸数から予測される分子量と一致した。

(3) NTS腎炎の誘導

抗糸球体基底膜血清を40匹のWKYラットに第1日目に腹腔内投与 (2 mL/kg 体重) し、NTS腎炎を誘導した後、DTT (1 mmol/L , n=8) 、デキサメタゾン (DEX ; 0.17mg/kg 体重, n=8) 、G 1 (1 mg/kg 体重, n=8) 、G 3 (1 mg/kg 体重, n=8) 、G 9 (1 mg/kg

体重, $n=8$) をそれぞれ含有する P B S を隔日に 2 週間投与した。尿を集めて、24 時間の尿蛋白排出量を測定した。

W K Y ラットを第 14 日目に屠殺し、それらの腎組織を用いて、光学顕微鏡による観察、蛍光抗体法、アポトーシスを検討するための *in situ* TUNEL 法 (*in situ* terminal deoxytransferase (TdT)-mediated uridine triphosphate (dUTP) nick end labeling reaction) を行なった。

また別の実験として、20 匹の N T S 腎炎 ($n=20$) および 20 匹の正常腎 ($n=20$) を準備し、それぞれに 1 mmol/L D T T、D E X、G 1、G 3 または G 9 を含む P B S を投与した。この 10 群 (それぞれ $n=4$) を第 8 日目に屠殺し、それぞれの組織を用いて、酵素抗体法 (免疫ペルオキシダーゼ染色) による C D 4 陽性細胞および C D 8 陽性細胞の検出、F A C S (fluorescence-activated cell sorter) 解析を行なった。

なお、糸球体内の C D 8 陽性細胞は、第 3 日目から出現し、その後第 11 日目まで次第に減少するため、第 8 日目に屠殺した。

(4) 光学顕微鏡による観察

組織は、10% ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した後、3 μ m 厚の切片を作製した。切片は P A S (periodic acid-Schiff) で染色した。それぞれの動物で 50 個の糸球体の直径を計測し、糸球体内総細胞数、半月体をもつ糸球体数をカウントした。

(5) 蛍光抗体法 (免疫蛍光顕微鏡による観察)

4 μ m 厚のクリオスタット切片を F I T C でラベルしたヤギ抗ウサギ I g G、ヤギ抗ラット I g G、ヤギ抗ラット C 3 抗体、ヤギ抗ラッ

トフィブリノーゲン抗体 (Cappel, Costa Mesa, CA, USA) で染色した。蛍光強度を以下の指標によって評価した。

(-) = 陰性 ; (+) = 弱陽性 ; (++) = 中等度陽性 ; (+++) = 陽性 ; (+++++) = 強陽性

さらに、2 μ m厚の連続クリオスタット切片を用意した。増殖マーカーであるKi-67の染色に、切片を氷上でアセトン固定し、さらに10分間煮沸した。これらの切片をKi-67に対するマウスモノクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) で2時間染色した。連続切片をさらにラット単球/マクロファージに対するマウスモノクローナル抗体 (ED1; Serotec, Oxford, UK)、および α -平滑筋アクチン (α -SMA; Sigma) に対するマウスモノクローナル抗体で1時間染色した。最後にFITCで標識した抗マウスIgG (Cappel) で30分間染色した。糸球体1個あたりのKi-67, ED1, α -SMA陽性細胞数をカウントした。ラット1匹あたり20個の糸球体を観察し、陽性細胞数の平均値を求めた。

(6) 酵素抗体法 (免疫ペルオキシダーゼ染色)

糸球体への白血球の浸潤を酵素抗体法によって検討した。酵素抗体法は、免疫ペルオキシダーゼABC kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて行なった。

まず、クリオスタット切片を、ラット白血球に対するマウスモノクローナル抗体 (OX1)、ラット単球/マクロファージに対するマウスモノクローナル抗体 (ED1)、ラットCD4またはCD8に対するマウスモノクローナル抗体 (Serotec) と60分間反応させた。次いで、ビスチンで標識したウマ抗マウスIgGと22℃で30分間反応させた後、3,3-diamino-benzidineおよび過酸化水素に反応させた。茶色

の反応産物を有する細胞数をカウントすることにより、糸球体におけるOX1、ED1、CD4、CD8陽性細胞数をカウントした。ラット1匹あたり20個の糸球体を観察し、陽性細胞数の平均値を求めた。

(7) 腎組織におけるin situ TUNEL法

腎組織中のアポトーシス細胞を、FITC-dUPTを用いたin situ TUNEL法 (In Situ Cell Death Detection kit; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) により検討した。

4 μ m厚のクリオスタット切片を用意し、4% パラホルムアルデヒドを用いて22℃で20分間固定した。氷上で2分間、0.1% Triton X-100、0.1% sodium citrateで切片を処理した。さらにTUNEL反応混合物を暗所にて加湿条件下で60分間処理した。それぞれのWKYラットについて50個の糸球体を検討し、糸球体1個あたりのアポトーシス細胞数をカウントした。

(8) 抗ウサギIgG抗体のELISAによる測定

ラット血清中の抗ウサギIgG抗体の抗体価をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) によって検討した。

96穴ウェルの各ウェルに正常ウサギIgGを50 μ L (10mg/ml; Chemicon, Temecula, USA) 加えて22℃で一晩インキュベートした。その翌日、第14日目に採血した血清を40倍に希釈し、各ウェルに50 μ Lずつ添加して2時間反応させた。その後、アルカリフォスファターゼで標識したウサギ抗ラットIgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) を2000倍に希釈して各ウェルに添加し、2時間反応させた。最後に、p-nitrophenyl phosphate溶液 (Sigma) を各ウェルに添加し、1時間反応させた。405nmにおける吸光度をマイ

クロプレートリーダー (Japan Bio-Rad, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

(9) FACS 解析

脾臓より単離した単核球を CD 4、CD 8 染色、TUNEL 反応に供した。

まず脾臓をホモゲナイズして RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) に懸濁した。次いで、エンドトキシンを含まない Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に重層して 2000rpm で 20 分間遠心した。単核球を回収し、4℃ の PBS で 2 回洗浄し、 2×10^7 cells/mL に調整した。細胞をフィコエリトリン (phycoerythrin) で標識した抗ラット CD 4 抗体 (Serotec)、あるいはフィコエリトリンで標識した抗ラット CD 8 抗体 (Antigenix America, Franklin Square, NY, USA) で染色した後、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 100 μ L で固定した。遠心後に固定液を除去し、細胞を 0.1% Triton X-100 および 0.1% sodium citrate を用いて氷上で 2 分間処理した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、50 μ L の TUNEL 反応混合物 (fluorescein-dUTP および TdT を含む) と反応させた (In Situ Cell Death Detection Kit)。反応後、暗所にて加湿容器内において、37℃ で 60 分間反応させ、PBS で 2 回洗浄した後、two-color flow cytometry (FACS Caribur 3A; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) を用いて、T 細胞のアポトーシスの割合を解析した。

(10) 投与された外因性ガレクチン-9 の腎臓における分布

ガレクチン-9 (1 mg/kg 体重) を正常 WKY ラットに投与し、投与 4 時間後に屠殺した。腎臓のクリオスタット切片を用意し、抗myc

抗体 (Invitrogen) に反応させた。さらに、ローダミン (rhodamine) で標識したウマ抗マウス Ig G 抗体 (Vector Laboratories) で染色した。さらに、二重染色のため、ウサギ抗ガレクチン-9 抗体 (Wada J. ら, J. Biol. Chem. 272: 6078-6086, 1997; Wada J. ら, J. Clin. Invest 99: 2452-2461, 1997)、続いて FITC で標識したラバ抗ウサギ Ig G (Chemicon) で染色した。二次抗体は既に他の動物の血清タンパク質で吸着しており、他種 Ig G に対する交差反応性はない。投与された外因性の融合タンパク質のみが C 末端に myc を有し、内因性のガレクチン-9 に myc エピトープは存在しないため、抗 myc 抗体により両者の区別が可能である。

(1.1) 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。ANOVA 検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意とした。フィッシャー解析も行なった。

2. 結果

(1) 尿蛋白排出量の定量結果

NTS 腎炎ラットの尿蛋白排出量の定量結果を図 2 に示す。なお、図 2 中、A、B、C、D の (■) は、NTS 腎炎ラットに DTT を含有する PBS を投与したときの尿蛋白排出量を示し、A、B、C、D の (●) は、NTS 腎炎ラットにそれぞれ G1、G3、G9、DEX を含有する PBS を投与したときの尿蛋白排出量を示す。

正常ウサギ血清を投与した対照ラットが 24 時間で排出した尿蛋白量は、 $1.9 \pm 0.4 \text{ mg/day}$ と少量であった。

一方、NTS 腎炎ラットにおいては、図 2 A~D に示すように、第 1 週目では少量の蛋白尿であったが、第 2 週目では進行性に尿蛋白排

出量が増加し、14日目には $35.8 \pm 7.1 \text{ mg/day}$ に達した。

これに対して、デキサメタゾン、G 1、G 3、G 9を投与したNTS腎炎ラットにおいては、図2A～Dに示すように、1日あたりの尿蛋白排出量が有意に抑制された。すなわち、デキサメタゾンを投与したNTS腎炎ラット群では、尿蛋白排出量が顕著に減少し、14日目の尿蛋白排出量は $2.3 \pm 0.4 \text{ mg/day}$ であった。また同様に、G 1、G 3、G 9を投与したNTS腎炎ラット群でも尿蛋白排出量が顕著に減少し、14日目の尿蛋白排出量は、それぞれ 5.6 ± 1.8 、 11.6 ± 2.3 、 $9.5 \pm 4.5 \text{ mg/day}$ であった。

以上の結果より、G 1、G 3およびG 9が、腎炎によって生じる蛋白尿を抑制する作用を有することが示された。

(2) 光学顕微鏡および免疫蛍光顕微鏡による所見

NTS腎炎ラットにおける糸球体の肥大と細胞過多に関する検査結果を表1に示す。また、NTS腎炎ラットの糸球体へのラットIgG、C 3、フィブリノーゲンの沈着に関する検査結果を表2に示す。また、NTS腎炎ラットの腎臓標本の光学顕微鏡および免疫蛍光顕微鏡による検査結果を図3に示す。

[表 1]

	糸球体の直径 (μm)	糸球体内細胞の総数 (個/糸球体)	細胞性半月体 (%)
PBS	206.3 ± 40.2	167 ± 32	56 ± 10
G1	143.8 ± 32.1	61 ± 24	5 ± 2
G3	150.0 ± 34.8	72 ± 18	8 ± 3
G9	146.6 ± 36.2	66 ± 23	5 ± 2

DEX 131.3±20.4

52±15

3±8

〔表 2〕

	I g G	C 3	フィブリノーゲン
PBS	(++++)	(++)	(++++)
G1	(+++)	(++)	(-)
G3	(+++)	(++)	(-)
G9	(+++)	(++)	(-)
DEX	(-)	(-)	(-)

なお、表 1、表 2 および図 3 中、「PBS」は、NTS 腎炎ラットに DTT を含む PBS を投与したときの結果を、「G 1」、「G 3」、「G 9」、「DEX」は、NTS 腎炎ラットにそれぞれ G 1、G 3、G 9、DEX を含む PBS を投与したときの結果を示す（以下の他の表および図においても同様）。また、表 2 中、（-）は陰性を、（+）は弱陽性を、（++）は中等度陽性を、（+++）は陽性を、（++++）は強陽性を示す。また、図 3 中、「LM」は光学顕微鏡による検査結果を示す。

表 1 に示すように、NTS 腎炎を惹起したラット腎臓においては、光学顕微鏡による検査の結果、糸球体の肥大と糸球体における細胞の過多を認められた。また、NTS 腎炎ラット群では、表 1 および図 3 d に示すように、約 56% の糸球体において細胞性半月体（cellular crescent）が認められるとともに、強い壊死性病変が糸球体内に認められた。また、NTS 腎炎ラット群では、免疫蛍光顕微鏡による検査の結果、表 2 および図 3 a - c に示すように、ラット I g G の線状および顆粒状の沈着と、ラット C 3 およびフィブリノーゲンの顆粒状の

沈着とが、糸球体の係蹄壁に認められた。

これに対して、デキサメタゾン投与したNTS腎炎ラット群では、表1および図3 tに示すように、半月体形成が認められた糸球体は3%以下であり、有意な細胞増殖や糸球体肥大は認められなかった。また、表2および図3 q-sに示すように、ラットIgG、C3およびフィブリノーゲンの糸球体内への沈着は認められなかった。

一方、G1、G3、G9を投与したNTS腎炎ラット投与群では、免疫蛍光顕微鏡および光学顕微鏡による検査の結果、デキサメタゾン投与したNTS腎炎ラット群とほぼ同様な形態学的変化が認められた。すなわち、表1および図3 h、l、pに示すように、半月体が認められた糸球体は5~8%であり、糸球体の細胞増加は認められなかった。また、表2および図3 e~g、i~k、m~oに示すように、フィブリノーゲンの糸球体内への沈着は認められなかったが、ラットIgGとC3の糸球体沈着は抑制されなかった。

なお、全ての対照群および実験群において、外因性に投与されたウサギIgGは線状に染色され変化は認められなかった。

以上の結果より、G1、G3、G9が、腎炎によって生じる糸球体の肥大、糸球体における細胞の過多および半月体形成、糸球体内へのフィブリノーゲンの沈着等の糸球体病変を抑制する作用を有することが示された。

(3) 糸球体内へ浸潤した細胞と糸球体内における細胞増殖の定量結果

NTS腎炎ラットの糸球体内へ浸潤した細胞と糸球体内における細胞増殖の定量結果を図4に示す。図4中、Aの(□)は第8日目に糸球体内へ浸潤したCD8陽性細胞の数(個/糸球体)を、Aの(■

）は第8日目に糸球体内へ浸潤したCD4陽性細胞の数（個／糸球体）を示し、Bの（□）は第14日目に糸球体内へ浸潤した白血球の数（個／糸球体）を、Bの（■）は第14日目に糸球体内へ浸潤した単球／マクロファージの数（個／糸球体）を示す。

酵素抗体法（免疫ペルオキシダーゼ反応）によって、NTS腎炎ラットの糸球体内における炎症細胞を検出したところ、図4Aに示すように、第8日目には、糸球体内へ浸潤したCD8陽性細胞とCD4陽性細胞の個数がそれぞれ 3.5 ± 0.8 個／糸球体、 0.9 ± 0.2 個／糸球体であった。また、図4Bに示すように、14日目には、糸球体内へ浸潤した白血球の個数は顕著に増加して、 28.3 ± 3.4 個／糸球体に達し、その細胞のほとんど（ 25.0 ± 2.6 個／糸球体）はマクロファージであった。

これに対して、デキサメタゾンを投与したNTS腎炎ラット群では、図4Aに示すように、第8日目には、糸球体内へ浸潤したCD8陽性細胞の個数が 0.6 ± 0.2 個／糸球体に減少した。また、図4Bに示すように、第14日目には、糸球体内へ浸潤したマクロファージの個数が 2.3 ± 0.1 個／糸球体に減少した。

一方、G1、G3を投与したNTS腎炎ラット群では、図4Aに示すように、CD8陽性細胞の浸潤を抑制できなかったが、これとは対照的に、G9を投与したNTS腎炎ラット群では、図4Aに示すように、CD8陽性細胞の浸潤を有意に抑制し、糸球体内へ浸潤したCD8陽性細胞の個数は 1.2 ± 0.2 個／糸球体に減少した。また、G1、G3、G9を投与したNTS腎炎ラット群では、図4Bに示すように、糸球体内へのマクロファージの浸潤を有意に抑制した。

また、NTS腎炎ラットにおける腎臓標本の免疫蛍光顕微鏡による検査結果および糸球体内における増殖細胞の定量結果を、それぞれ図

5 A、Bに示す。なお、図5 A中、(a)はED 1、(b)はKi-67、(c)は α -SMAに関する結果を示し、図中の白線は100 μ mの長さを示す。また、図5 B中、(■)はED 1陽性細胞数(個/糸球体)、(□)はKi-67陽性細胞数(個/糸球体)を示す。

増殖マーカーであるKi-67と単球/マクロファージの細胞型マーカーであるED-1とを腎組織連続切片上で検出した結果、PBSを投与したNTS腎炎ラット群では、図5 A(a)、(b)に示すように、Ki-67の免疫反応性が糸球体の核で観察され、それらのほとんどで単球/マクロファージのマーカーであるED-1も陽性であった。また、PBSを投与したNTS腎炎ラット群の糸球体では、ED-1陽性細胞(24 \pm 8個/糸球体)とKi-67陽性細胞(22 \pm 7個/糸球体)が多量に認められたが、G1、G3、G9およびデキサメタゾン投与したNTS腎炎ラット群においては、ED-1陽性細胞とKi-67陽性細胞の発生が有意に抑制された。これに対して、 α -SMAの分布はED-1とKi-67の分布と異なっており、PBSを投与したNTS腎炎ラット群においては、メサンギウム細胞の一部のみが α -SMA陽性であった(図5 A(c))。この結果により、メサンギウム細胞の増殖活性は低く、NTS腎炎での糸球体細胞の蓄積は糸球体へのマクロファージの流入と増殖によるものであることが示された。

以上の結果より、G1、G3、G9が、糸球体腎炎等の糸球体疾患の原因となるマクロファージの糸球体内浸潤を抑制する作用を有することが示された。さらに、G9は、糸球体腎炎等の糸球体疾患の原因となるCD8陽性細胞の糸球体内浸潤を抑制する作用を有することが示された。

(4) E L I S Aによる末梢血抗ウサギ I g G抗体 (circulating anti-rabbit IgG) レベルの測定

E L I S Aによる末梢血抗ウサギ I g G抗体レベルの測定結果を図6に示す。図6に示すように、デキサメタゾンの投与により抗ウサギ I g G抗体の産生は完全に阻害されたが、G 1、G 3、G 9の投与は抗体産生に影響を及ぼさなかった。

この結果より、ステロイドホルモンであるデキサメタゾンは、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞 (C D 4 陽性T細胞)、B細胞などの免疫担当細胞の抗体産生に関与する機能を阻害・抑制するが、G 1、G 3、G 9はこれら免疫担当細胞の抗体産生に関与する機能を阻害・抑制しないこと、すなわち、免疫抑制という副作用は、G 1、G 3、G 9の方がステロイドホルモンであるデキサメタゾンよりも少ないことが明らかとなった。

(5) 腎組織のin situ T U N E Lアッセイ

腎組織のin situ T U N E Lアッセイの結果を図7に示す。図7 Aの矢印は、P B Sを投与したN T S腎炎ラット群において観察されたT U N E L陽性アポトーシス細胞を示す。なお、図7 A中、白線は50 μ mの長さを示す。また、図7 Bは、N T S腎炎ラットの糸球体内に存在するアポトーシス細胞の数 (個/糸球体) を示す。

図7 Aに示すように、P B Sを投与したN T S腎炎ラット群において、14日目の糸球体内にアポトーシス細胞はほとんど認められなかった。また、図7 Bに示すように、デキサメタゾン、G 1、G 3、G 9のいずれかを投与したN T S腎炎ラット群の腎組織においてはアポトーシス細胞の増加は認められなかった。

(6) 脾臓より分離されたT細胞のアポトーシスアッセイ

正常ラット群の脾臓より分離されたT細胞のアポトーシスアッセイ (FACS解析) の結果を表3および図8に示す。表3および図8中の数値は、CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞のうちアポトーシス細胞の割合(%)を表す。

[表3]

	正常ラット		NTS腎炎ラット	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
PBS	6.8±1.8	7.0±2.1	5.7±1.8	4.8±2.0
G1	9.1±2.0	8.9±2.2	9.1±2.3	8.6±1.8
G3	8.1±1.6	6.4±1.8	5.9±2.1	7.0±1.6
G9	8.6±1.9	8.4±2.1	9.2±1.6	16.8±2.2
DEX	24.9±2.8	28.3±2.4	20.1±2.6	25.7±2.9

表3および図8に示すように、PBSを投与した正常ラット群の脾臓より分離したCD4陽性細胞とCD8陽性細胞のうち約7%が自発的にアポトーシスに至っていた。デキサメタゾンを投与した正常ラットにおけるアポトーシスは、CD4陽性細胞の約25%、CD8陽性細胞の約28%に認められたが、G1、G3、G9を投与した正常ラット群ではアポトーシスの有意な増加は見られなかった。

また、表3および図8に示すように、NTS腎炎ラット群では、脾臓より分離したCD4陽性細胞の約6%とCD8細胞の約5%が自発的にアポトーシスに至っており、アポトーシス細胞の割合はPBSを投与した正常ラット群と同様であった。

これに対して、デキサメタゾンを投与したNTS腎炎ラット群では

、CD4陽性細胞の約20%、CD8陽性細胞の約26%がアポトーシスに至っており、PBSを投与した正常ラット群と同様、デキサメタゾンの投与によりアポトーシスが増加した。一方、G1、G3を投与したNTS腎炎ラット群では、CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の5~9%がアポトーシスに至っており、G1、G3により誘導されるアポトーシスは、基礎レベルと同様であった。しかし、G9を投与したNTS腎炎ラット群では、CD4陽性細胞の約9%、CD8陽性細胞の約17%がアポトーシスに至っており、G9の投与により誘導されるCD4陽性細胞のアポトーシスは基礎レベルに留まるのに対してCD8陽性細胞のアポトーシスは促進していた。

以上の結果により、デキサメタゾンは休止T細胞および活性化T細胞のいずれにおいてもアポトーシスが誘導するが、G9はNTS腎炎ラット群における活性化CD8陽性T細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導することが示された。すなわち、G9は、糸球体腎炎等の糸球体疾患の原因となるCD8陽性細胞の糸球体内浸潤を選択的に抑制する作用を有し、デキサメタゾンと異なり、CD8陽性細胞に非選択的なアポトーシスを誘導するという副作用を有しないことが示された。

(7) 投与された外因性ガレクチンの腎組織における分布

投与された外因性ガレクチンの腎組織における分布を図9に示す。

投与された外因性G9を抗c-myc抗体により検出したところ、図9に示すように、外因性G9は糸球体内皮細胞と尿細管周囲の毛細血管に分布した(図9の赤色部分)。また、糸球体係蹄と尿細管周囲の毛細血管の内皮細胞はすべてが陽性ではなく一部が陽性であった。内因性G9は既に報告されているように糸球体細胞に検出されており、内

皮細胞とメサングウム細胞のいずれにも分布していた（Wada J. ら, J. Clin. Invest. 99 : 2452-2461, 1997）。二重染色法により投与された外因性 G 9 は糸球体係蹄内皮細胞に主に分布し、その分布パターンが内因性 G 9 とは異なっていた。

G 1 と G 3 のマクロファージの糸球体内浸潤抑制効果は、投与された外因性 G 1、G 3 が内皮細胞やマクロファージ上に発現した糖鎖を架橋して両者の接着を抑制することにより発揮されるものと考えられる。糸球体内皮細胞に外因性ガレクチンの免疫組織学的局在が確認されたことはこの考えを支持する。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規な腎炎の予防・治療剤、糸球体疾患の予防・治療剤、白血球の糸球体内浸潤抑制剤、CD 8 陽性細胞の糸球体内浸潤抑制剤および CD 8 陽性細胞のアポトーシス誘導剤が提供される。

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) または (b) に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする腎炎の予防・治療剤。

(a) 配列番号 1～3 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1～3 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

2. 以下の (a) または (b) に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする糸球体疾患の予防・治療剤。

(a) 配列番号 1～3 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1～3 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

3. 前記糸球体疾患が、糸球体肥大、糸球体内の細胞過多、半月体形成、白血球の糸球体内浸潤、CD8 陽性細胞の糸球体内浸潤およびフィブリノーゲンの糸球体内沈着からなる群より選択される 1 種以上の病変を示す糸球体疾患であることを特徴とする請求項 2 記載の糸球体疾患の予防・治療剤。

4. 前記糸球体疾患が、糸球体腎炎であることを特徴とする請求項 2 記載の糸球体疾患の予防・治療剤。

5. 以下の (a) または (b) に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする白血球の糸球体内浸潤抑制剤。

(a) 配列番号 1～3 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペ

プチド

(b) 配列番号 1 ~ 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

6. 前記白血球が、単球またはマクロファージであることを特徴とする請求項 5 記載の白血球の系球体内浸潤抑制剤。

7. 以下の (c) または (d) に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする CD 8 陽性細胞の系球体内浸潤抑制剤。

(c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

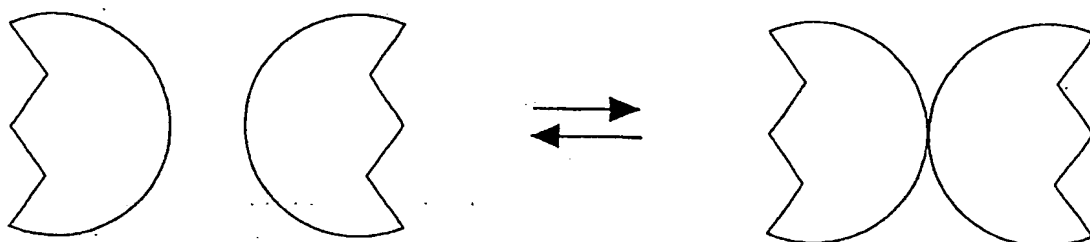
8. 以下の (c) または (d) に示すポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする CD 8 陽性細胞のアポトーシス誘導剤。

(c) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

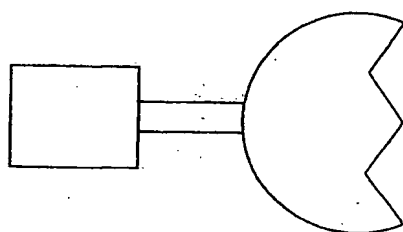
(d) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ガラクトシドに特異的な結合活性を有するポリペプチド

第1図


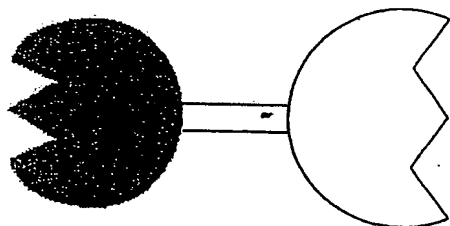
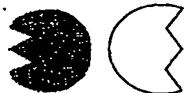
プロトタイプ(ガレクチン-1)



キメラタイプ(ガレクチン-3)

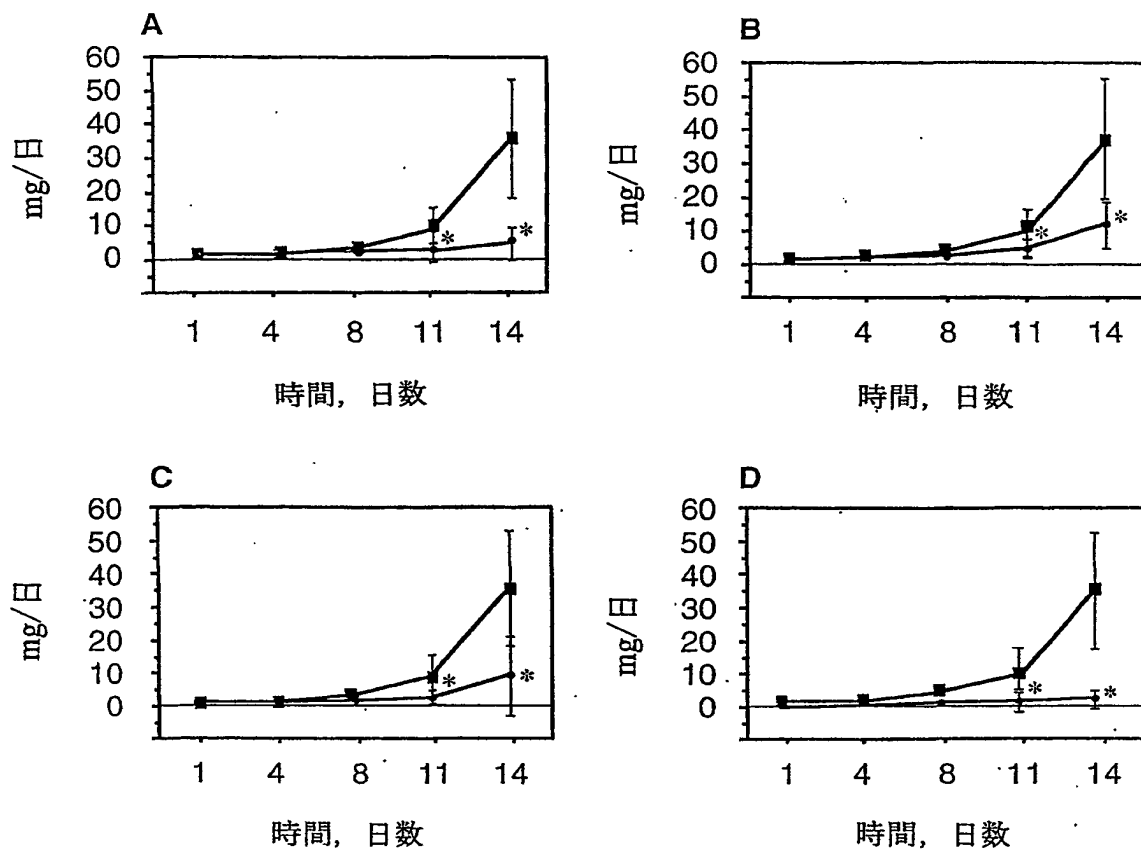


タンデムリピートタイプ(ガレクチン-9)

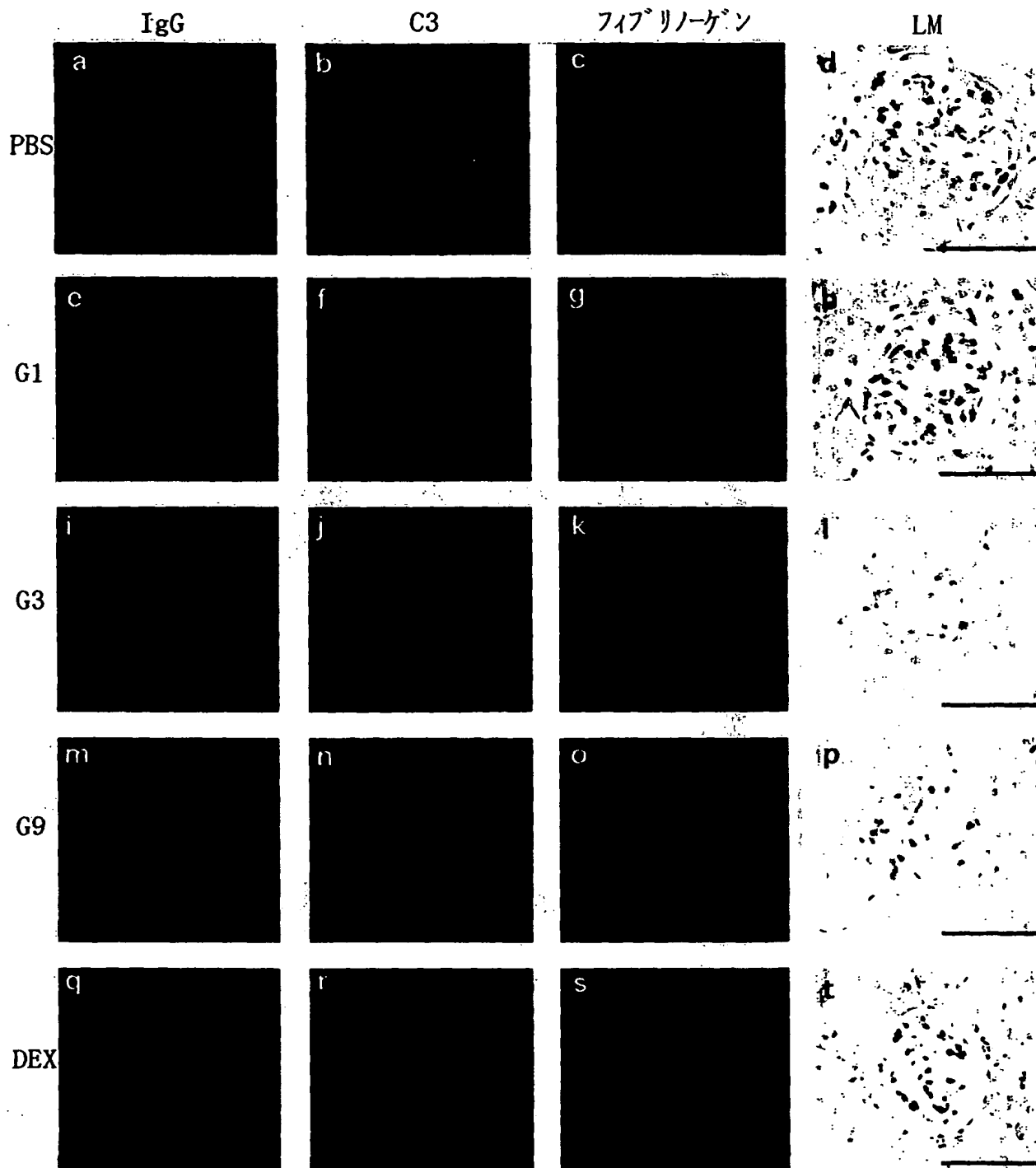
 = hnRNP 様ドメイン

= 糖鎖結合ドメイン

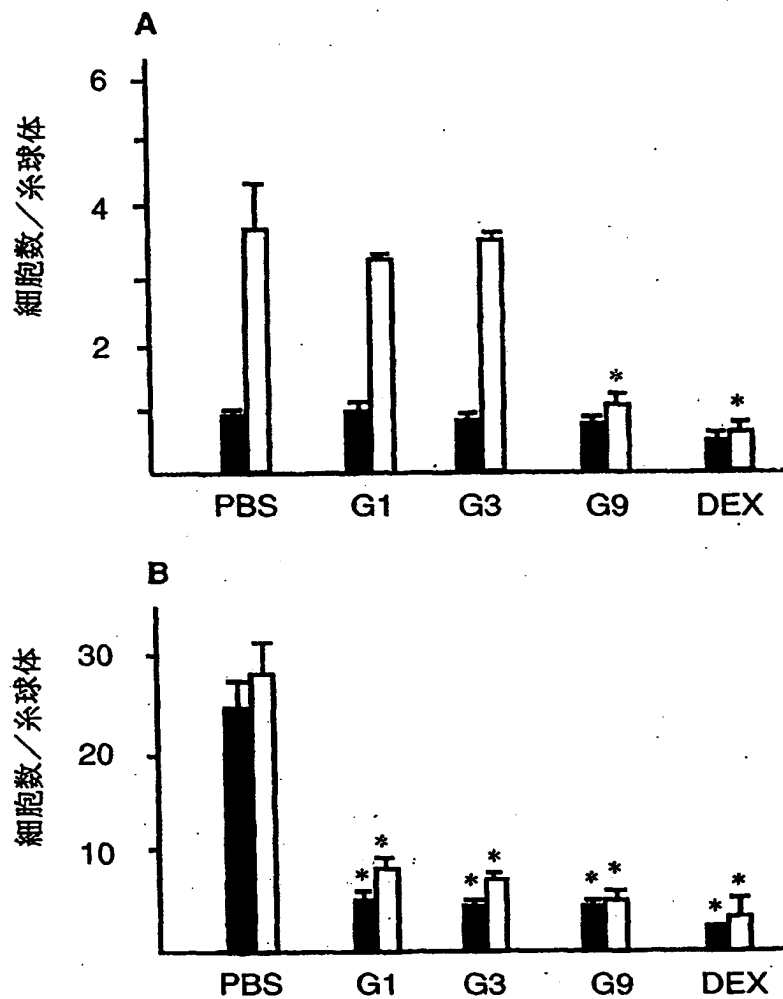
第2図



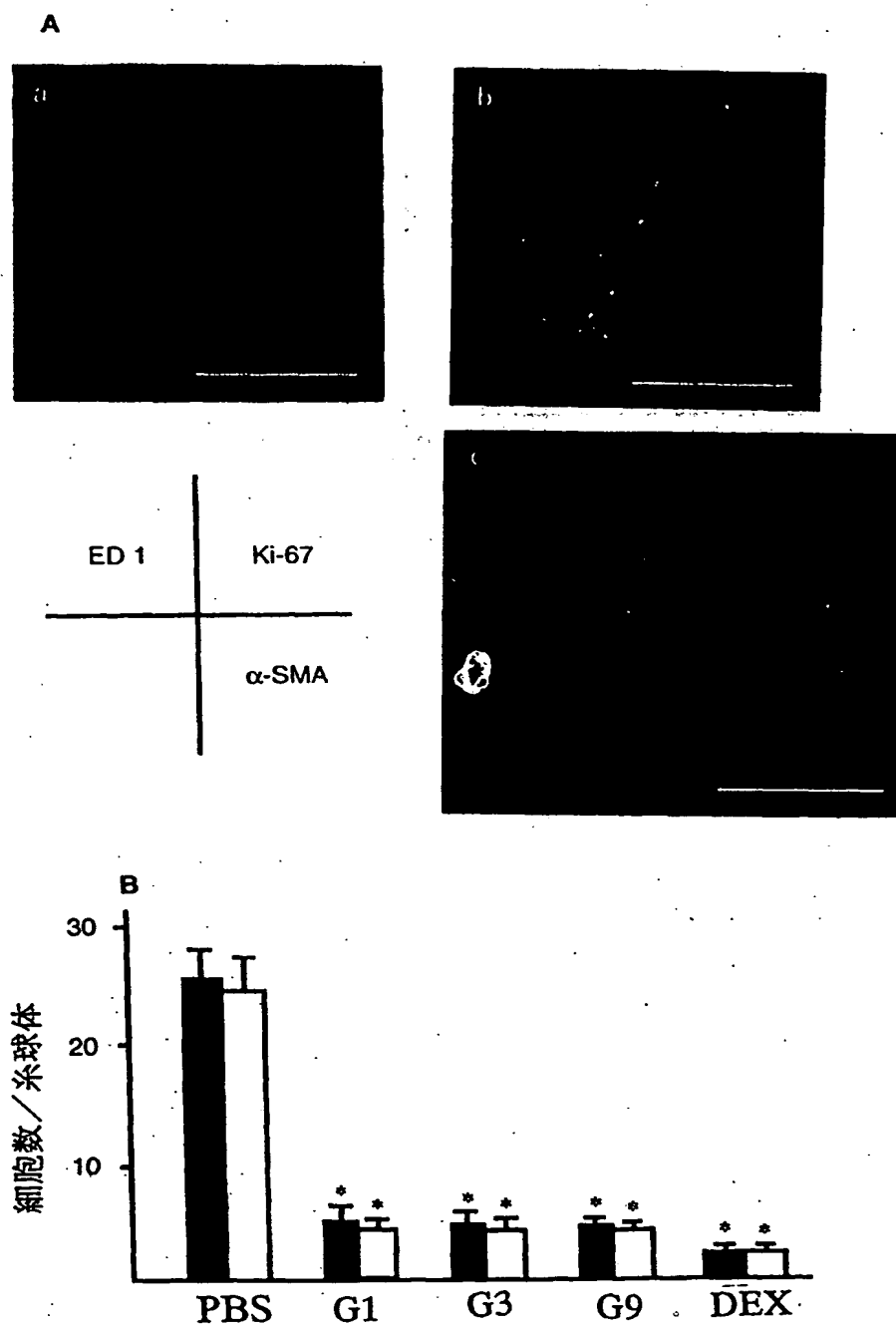
第3図



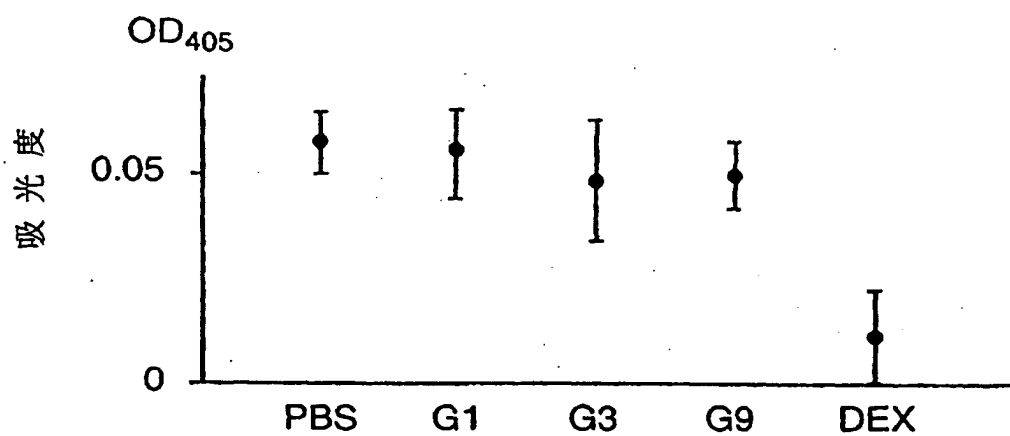
第4図



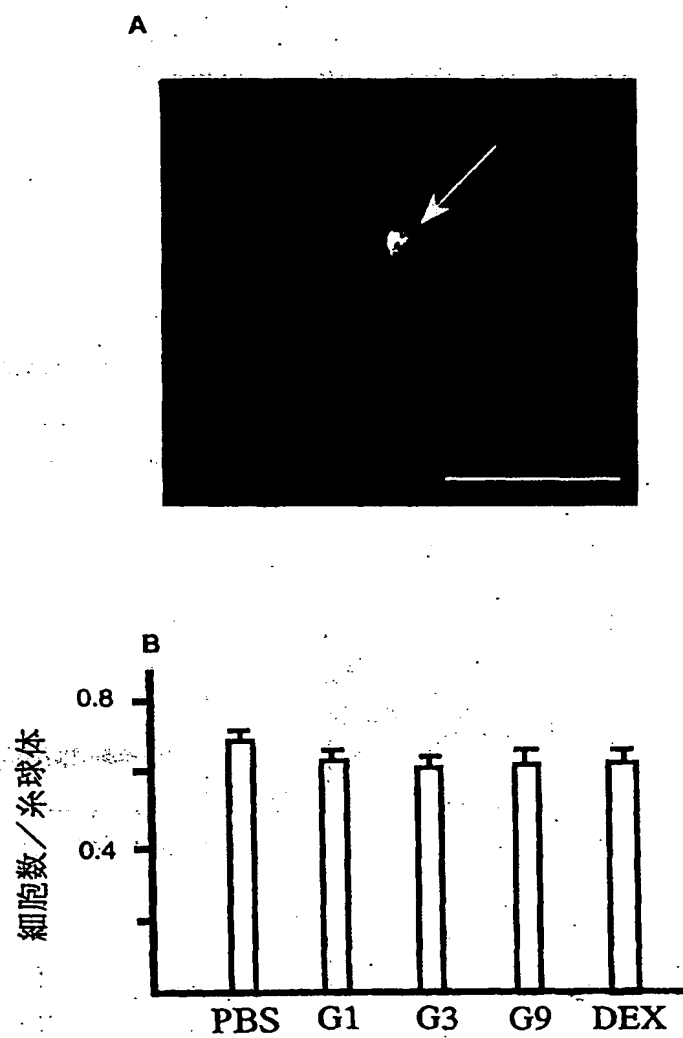
第5図



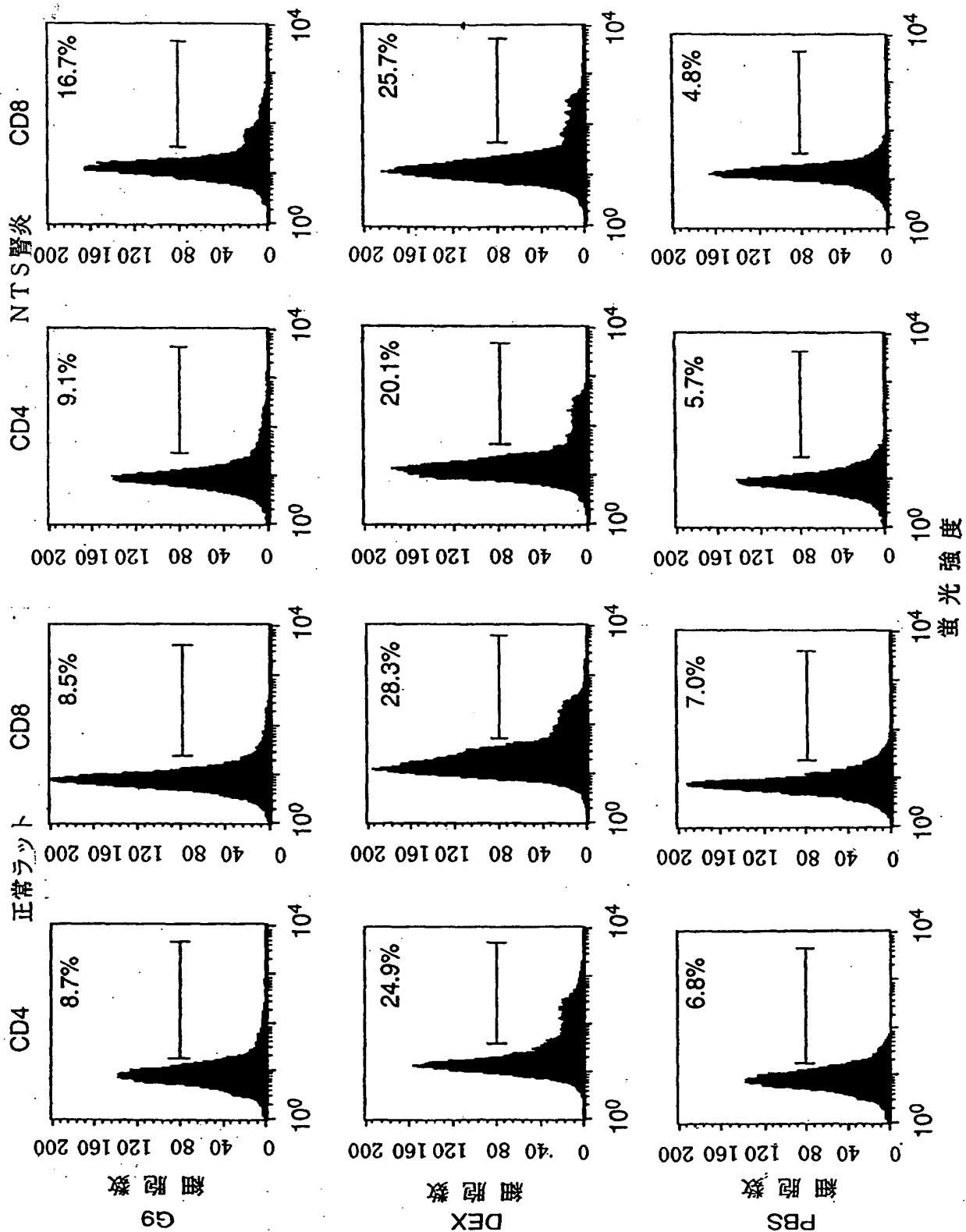
第6図



第7図



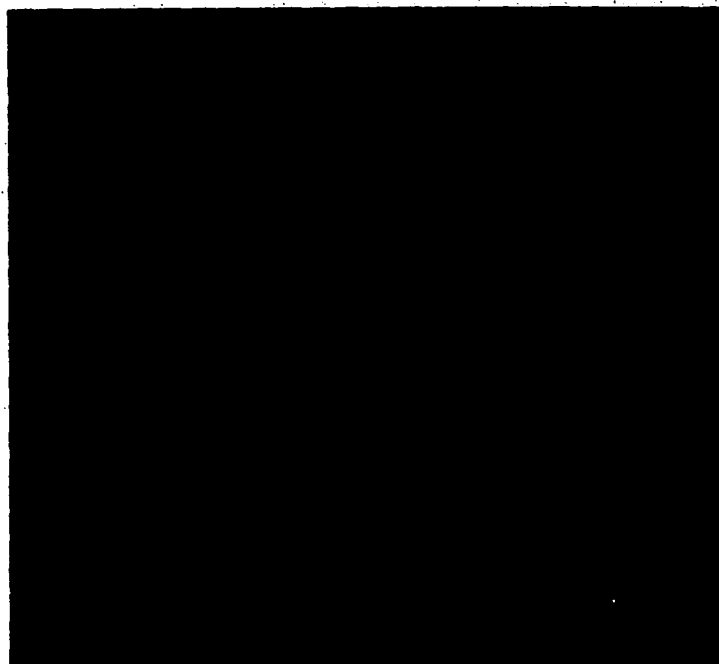
第 8 図



WO 02/089831

PCT/JP01/09574

第9図



SEQUENCE LISTING

<110> PROTEGENE INC., Jun Wada

<120> A pharmaceutical composition for treating or preventing nephritis

<130> PCT01-1005

<160> 12

<210> 1

<211> 135

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse galectin-1

<400> 1

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Cys Leu Lys Val Arg Gly Glu Val Ala Ser Asp Ala Lys Ser Phe Val

20

25

30

Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro

35

40

45

Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Thr Lys

50

55

60

Glu Asp Gly Thr Trp Gly Thr Glu His Arg Glu Pro Ala Phe Pro Phe

65

70

75

80

Gln Pro Gly Ser Ile Thr Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asp

85

90

95

Leu Thr Ile Lys Leu Pro Asp Gly His Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg

100

105

110

Leu Asn Met Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys

115

120

125

Ile Lys Cys Val Ala Phe Glu

130

135

<210> 2

<211> 264

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse galectin-3

<400> 2

Met Ala Asp Ser Phe Ser Leu Asn Asp Ala Leu Ala Gly Ser Gly Asn

1

5

10

15

Pro Asn Pro Gln Gly Tyr Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Gly Ala

20

25

30

Gly Gly Tyr Pro Gly Ala Ala Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala

35

40

45

Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly

50

55

60

Gln Ala Pro Pro Ser Ala Tyr Pro Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ala Tyr

65

70

75

80

Pro Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Pro Ala Pro Gly

85

90

95

Ala Phe Pro Gly Gln Pro Gly Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gln Cys Ser

100

105

110

Gly Gly Tyr Pro Ala Ala Gly Pro Tyr Gly Val Pro Ala Gly Pro Leu

115

120

125

Thr Val Pro Tyr Asp Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Met Pro Arg Met

130

135

140

Leu Ile Thr Ile Met Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg Ile Val

145

150

155

160

Leu Asp Phe Arg Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn Pro Arg

165

170

175

Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys Gln Asp

180

185

190

Asn Asn Trp Gly Lys Glu Glu Arg Gln Ser Ala Phe Pro Phe Glu Ser

195

200

205

Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Ala Asp His Phe Lys

210

215

220

Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg Met Lys

225

230

235

240

Asn Leu Arg Glu Ile Ser Gln Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile Thr Leu

245

250

255

Thr Ser Ala Asn His Ala Met Ile

260

<210> 3

<211> 322

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse galectin-9

<400> 3

Met Ala Leu Phe Ser Ala Gln Ser Pro Tyr Ile Asn Pro Ile Ile Pro
1 5 10 15

Phe Thr Gly Pro Ile Gln Gly Gly Leu Gln Glu Gly Leu Gln Val Thr
20 25 30

Leu Gln Gly Thr Thr Lys Ser Phe Ala Gln Arg Phe Val Val Asn Phe
35 40 45

Gln Asn Ser Phe Asn Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro Arg
50 55 60

Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Lys Gln Asn Gly Gln
65 70 75 80

Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Met Gln Met Pro Phe Gln Lys Gly Met
85 90 95

Pro Phe Glu Leu Cys Phe Leu Val Gln Arg Ser Glu Phe Lys Val Met
100 105 110

Val Asn Lys Lys Phe Phe Val Gln Tyr Gln His Arg Val Pro Tyr His
115 120 125

Leu Val Asp Thr Ile Ala Val Ser Gly Cys Leu Lys Leu Ser Phe Ile
130 135 140

Thr Phe Gln Thr Gln Asn Phe Arg Pro Ala His Gln Ala Pro Met Ala

145 150 155 160
Gln Thr Thr Ile His Met Val His Ser Thr Pro Gly Gln Met Phe Ser
 165 170 175
Thr Pro Gly Ile Pro Pro Val Val Tyr Pro Thr Pro Ala Tyr Thr Ile
 180 185 190
Pro Phe Tyr Thr Pro Ile Pro Asn Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile
 195 200 205
Met Ile Ser Gly Asn Val Leu Pro Asp Ala Thr Arg Phe His Ile Asn
 210 215 220
Leu Arg Cys Gly Gly Asp Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe Asn
225 230 235 240
Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asn Asn Ser Trp Gly Gln
 245 250 255
Glu Glu Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Pro Phe Ser Arg Gly Gln Ser
 260 265 270
Phe Ser Val Trp Ile Ile Cys Glu Gly His Cys Phe Lys Val Ala Val
 275 280 285
Asn Gly Gln His Met Cys Glu Tyr Tyr His Arg Leu Lys Asn Leu Gln
290 295 300

Asp Ile Asn Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp Ile Gln Leu Thr His Val
305 310 315 320

Gln Thr

<210> 4

<211> 135

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human galectin-1

<400> 4

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val
20 25 30

Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro
35 40 45

Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys
50 55 60

Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe

65

70

75

80

Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn

85

90

95

Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg

100

105

110

Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys

115

120

125

Ile Lys Cys Val Ala Phe Asp

130

135

<210> 5

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human galectin-3

<400> 5

Met Ala Asp Asn Phe Ser Leu His Asp Ala Leu Ser Gly Ser Gly Asn

1

5

10

15

Pro Asn Pro Gln Gly Trp Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Ala Gly

20

25

30

Ala Gly Gly Tyr Pro Gly Ala Ser Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln
35 40 45

Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro
50 55 60

Gly Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ala Pro Ala Pro Gly Val Tyr Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Pro Ser Ser Gly Gln Pro Ser
85 90 95

Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Ala Thr Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gly
100 105 110

Pro Leu Ile Val Pro Tyr Asn Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Val Pro
115 120 125

Arg Met Leu Ile Thr Ile Leu Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg
130 135 140

Ile Ala Leu Asp Phe Gln Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn
145 150 155 160

Pro Arg Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys
165 170 175

Leu Asp Asn Asn Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Val Phe Pro Phe

180

185

190

Glu Ser Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Pro Asp His

195

200

205

Phe Lys Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg

210

215

220

Val Lys Lys Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile

225

230

235

240

Asp Leu Thr Ser Ala Ser Tyr Thr Met Ile

245

250

<210> 6

<211> 355

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human galectin-9 (Long isoform)

<400> 6

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro

1

5

10

15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr

20

25

30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn

35

40

45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

50

55

60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly

65

70

75

80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly

85

90

95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val

100

105

110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe

115

120

125

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr

130

135

140

Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser

145

150

155

160

Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly

165

170

175

Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile

180	185	190
Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe		
195	200	205
Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro		
210	215	220
Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser		
225	230	235 240
Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile		
245	250	255
Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe		
260	265	270
Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly		
275	280	285
Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln		
290	295	300
Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala		
305	310	315 320
Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu		
325	330	335

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His

340

345

350

Val Gln Thr

355

<210> 7

<211> 135

<212> PRT

<213> Ruttus norvegicus

<220>

<223> rat galectin-1

<400> 7

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Cys Leu Lys Val Arg Gly Glu Leu Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val

20

25

30

Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro

35

40

45

Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys

50

55

60

Asp Asp Gly Thr Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Thr Ala Phe Pro Phe

65

70

75

80

Gln Pro Gly Ser Ile Thr Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asp

85

90

95

Leu Thr Ile Lys Leu Pro Asp Gly His Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg

100

105

110

Leu Asn Met Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys

115

120

125

Ile Lys Cys Val Ala Phe Glu

130

135

<210> 8

<211> 262

<212> PRT

<213> Ruttus norvegicus

<220>

<223> rat galectin-3

<400> 8

Met Ala Asp Gly Phe Ser Leu Asn Asp Ala Leu Ala Gly Ser Gly Asn

1

5

10

15

Pro Asn Pro Gln Gly Trp Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Gly Ala

20

25

30

Gly Gly Tyr Pro Gly Ala Ser Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala

35

40

45

Pro Pro Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Ser Ala Tyr Pro Gly

50

55

60

Pro Thr Gly Pro Ser Ala Tyr Pro Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ala Tyr

65

70

75

80

Pro Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ala Phe Pro Gly Gln Pro Gly Gly Pro

85

90

95

Gly Ala Tyr Pro Ser Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Ser Ala Pro Gly Ala

100

105

110

Tyr Pro Ala Thr Gly Pro Phe Gly Ala Pro Thr Gly Pro Leu Thr Val

115

120

125

Pro Tyr Asp Met Pro Leu Pro Gly Gly Val Met Pro Arg Met Leu Ile

130

135

140

Thr Ile Ile Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Ser Ile Thr Leu Asn

145

150

155

160

Phe Lys Lys Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro Arg Phe Asn

165

170

175

Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys Gln Asp Asn Asn

180

185

190

Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Ala Phe Pro Phe Glu Ser Gly Lys

195

200

205

Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Ala Asp His Phe Lys Val Ala

210

215

220

Val Asn Asp Val His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg Met Lys Asn Leu

225

230

235

240

Arg Glu Ile Ser Gln Leu Gly Ile Ile Gly Asp Ile Thr Leu Thr Ser

245

250

255

Ala Ser His Ala Met Ile

260

<210> 9

<211> 354

<212> PRT

<213> Ruttus norvegicus

<220>

<223> rat galectin-9 (Long isoform)

<400> 9

Met Ala Phe Phe Ser Thr Gln Pro Pro Tyr Met Asn Pro Val Ile Pro

1

5

10

15

Phe Thr Gly Ile Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asn Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Leu Gln Gly Thr Val His Pro Phe Pro Asn Arg Ile Ala Val Asn Phe
35 40 45

Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro Arg
50 55 60

Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Lys Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Met Gln Met Pro Phe Gln Lys Gly Met
85 90 95

Pro Phe Glu Leu Cys Phe Leu Val Gln Arg Ser Glu Phe Lys Val Met
100 105 110

Val Asn Lys Asn Phe Phe Val Gln Tyr Ser His Arg Val Pro Tyr His
115 120 125

Leu Val Asp Thr Ile Ser Val Ser Gly Cys Leu His Leu Ser Phe Ile
130 135 140

Asn Phe Gln Asn Ser Thr Ala Ala Pro Val Gln Pro Val Phe Ser Thr
145 150 155 160

Met Gln Phe Ser Gln Pro Val Gln Phe Pro Arg Met Pro Lys Gly Arg

165

170

175

Lys Gln Arg Thr Gln Gly Phe Gln Pro Ala Leu Gln Ala Pro Val Ala

180

185

190

Gln Thr Ile Ile His Thr Val His Ser Ile Pro Gly Gln Met Leu Ser

195

200

205

Thr Pro Gly Ile Pro Pro Met Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Tyr Thr Ile

210

215

220

Pro Phe Phe Thr Ser Ile Pro Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Lys Ser Ile

225

230

235

240

Asn Ile Ser Gly Val Val Leu Pro Asp Ala Lys Arg Phe His Ile Asn

245

250

255

Leu Arg Cys Gly Gly Asp Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe Asn

260

265

270

Glu Lys Val Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asn Asn Ser Trp Gly Pro

275

280

285

Glu Glu Arg Ser Leu Pro Gly Arg Met Pro Phe Asn Arg Gly Gln Ser

290

295

300

Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Gly His Cys Phe Lys Val Ala Val

305

310

315

320

Asp Gly Gln His Ile Cys Glu Tyr Tyr His Arg Leu Lys Asn Leu Pro
 325 330 335

Asp Ile Asn Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp Ile Gln Leu Thr His Val
 340 345 350

Gln Thr

<210> 10

<211> 545

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (72).. (479)

<220>

<223> mouse galectin-1 gene

<400> 10

cgctctctcgg gtggagtcctt ctgactgctg gaggagcagg tctcaggaat ctcttcgctt 60

cagcttcaat c atg gcc tgt ggt ctg gtc gcc agc aac ctg aat ctc aaa 110

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys

1

5

10

cct ggg gaa tgt ctc aaa gtt cgg gga gag gtg gcc tcg gac gcc aag 158

Pro Gly Glu Cys Leu Lys Val Arg Gly Glu Val Ala Ser Asp Ala Lys

15

20

25

agc ttt gtg ctg aac ctg gga aaa gac agc aac aac ctg tgc cta cac 206

Ser Phe Val Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His

30

35

40

45

ttc aat cct cgc ttc aat gcc cat gga gac gcc aac acc att gtg tgt 254

Phe Asn Pro Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys

50

55

60

aac acc aag gaa gat ggg acc tgg gga acc gaa cac cgg gaa cct gcc 302

Asn Thr Lys Glu Asp Gly Thr Trp Gly Thr Glu His Arg Glu Pro Ala

65

70

75

ttc ccc ttc cag ccc ggg agc atc aca gag gtg tgc atc acc ttt gac 350

Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser Ile Thr Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp

80

85

90

cag gct gac ctg acc atc aag ctg cca gac gga cat gaa ttc aag ttc 398

Gln Ala Asp Leu Thr Ile Lys Leu Pro Asp Gly His Glu Phe Lys Phe

95

100

105

ccc aac cgc ctc aac atg gag gcc atc aac tac atg gcg gcg gat gga 446

Pro Asn Arg Leu Asn Met Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly

110

115

120

125

gac ttc aag att aag tgc gtg gcc ttt gag tga agccagccag cctgtagccc 499

Asp Phe Lys Ile Lys Cys Val Ala Phe Glu

130

135

tcaataaagg cagctgccctc tgctcccat ataaaaaaaa aaaaaa

545

<210> 11

<211> 955

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (44)..(838)

<220>

<223> mouse galectin-3 gene

<400> 11

agcactaatc aggtgagcgg cacagagagc actaccagc aaa atg gca gac agc 55

Met Ala Asp Ser

1

ttt tgc ctt aac gat gcc tta gct ggc tct gga aac cca aac cct caa 103

Phe Ser Leu Asn Asp Ala Leu Ala Gly Ser Gly Asn Pro Asn Pro Gln

5

10

15

20

gga tat ccg ggt gca tgg ggg aac cag cct ggg gca ggg ggc tac cca 151

Gly Tyr Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Gly Ala Gly Gly Tyr Pro

25	30	35	
ggg gct gcc tat cct ggg gcc tat cca gga cag gct cct cca ggg gcc			199
Gly Ala Ala Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala			
40	45	50	
tac cca gga cag gct cct cca ggg gcc tat cca gga cag gct cct cct			247
Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro			
55	60	65	
agt gcc tac ccc ggc cca act gcc cct gga gct tat cct ggc cca act			295
Ser Ala Tyr Pro Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Pro Thr			
70	75	80	
gcc cct gga gct tat cct ggt caa cct gcc cct gga gcc ttc cca ggg			343
Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Pro Ala Pro Gly Ala Phe Pro Gly			
85	90	95	100
caa cct ggg gca cct ggg gcc tac ccc cag tgc tct gga ggc tat cct			391
Gln Pro Gly Ala Pro Gly Ala Tyr Pro Gln Cys Ser Gly Gly Tyr Pro			
105	110	115	
gct gct ggc cct tat ggt gtc ccc gct gga cca ctg acg gtg ccc tat			439
Ala Ala Gly Pro Tyr Gly Val Pro Ala Gly Pro Leu Thr Val Pro Tyr			
120	125	130	
gac ctg ccc ttg cct gga gga gtc atg ccc cgc atg ctg atc aca atc			487
Asp Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Met Pro Arg Met Leu Ile Thr Ile			
135	140	145	

atg ggc aca gtg aaa ccc aac gca aac agg att gtt cta gat ttc agg 535
 Met Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg Ile Val Leu Asp Phe Arg
 150 155 160

aga ggg aat gat gtt gcc ttc cac ttt aac ccc cgc ttc aat gag aac 583
 Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn Pro Arg Phe Asn Glu Asn
 165 170 175 180

aac aga aga gtc att gtg tgt aac acg aag cag gac aat aac tgg gga 631
 Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys Gln Asp Asn Asn Trp Gly
 185 190 195

aag gaa gaa aga cag tca gcc ttc ccc ttt gag agt ggc aaa cca ttc 679
 Lys Glu Glu Arg Gln Ser Ala Phe Pro Phe Glu Ser Gly Lys Pro Phe
 200 205 210

aaa ata caa gtc ctg gtt gaa gct gac cac ttc aag gtt gcg gtc aac 727
 Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Ala Asp His Phe Lys Val Ala Val Asn
 215 220 225

gat gct cac cta ctg cag tac aac cat cgg atg aag aac ctc cgg gaa 775
 Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg Met Lys Asn Leu Arg Glu
 230 235 240

atc agc caa ctg ggg atc agt ggt gac ata acc ctc acc agc gct aac 823
 Ile Ser Gln Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile Thr Leu Thr Ser Ala Asn
 245 250 255 260

cac gcc atg atc taa gccagaaggg gcggcaccga aacgccctgt gtccttagg 878

His Ala Met Ile

265

agtgggaaac ttigcatitc tctctcctta tccttcttgt aagacatccc atttaataaa 938

gtctcatgct gagagag

955

<210> 12

<211> 1418

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (35)..(1000)

<220>

<223> mouse galectin-9 gene

<400> 12

ggaagagagc attggttccc ctgagataga agag atg gct ctc ttc agt gcc cag 55

Met Ala Leu Phe Ser Ala Gln

1

5

tct cca tac att aac ccg atc atc ccc ttt act gga cca atc caa gga 103

Ser Pro Tyr Ile Asn Pro Ile Ile Pro Phe Thr Gly Pro Ile Gln Gly

10

15

20

ggg ctg cag gag gga ctt cag gtg acc ctc cag ggg act acc aag agt 151
 Gly Leu Gln Glu Gly Leu Gln Val Thr Leu Gln Gly Thr Thr Lys Ser
 25 30 35

ttt gca caa agg ttt gtg gtg aac ttt cag aac agc ttc aat gga aat 199
 Phe Ala Gln Arg Phe Val Val Asn Phe Gln Asn Ser Phe Asn Gly Asn
 40 45 50 55

gac att gcc ttc cac ttc aac ccc cgg ttt gag gaa gga ggg tat gtg 247
 Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro Arg Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Val
 60 65 70

gtt tgc aac acg aag cag aac gga cag tgg ggt cct gag gag aga aag 295
 Val Cys Asn Thr Lys Gln Asn Gly Gln Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys
 75 80 85

atg cag atg ccc ttc cag aag ggg atg ccc ttt gag ctt tgc ttc ctg 343
 Met Gln Met Pro Phe Gln Lys Gly Met Pro Phe Glu Leu Cys Phe Leu
 90 95 100

gtg cag agg tca gag ttc aag gtg atg gtg aac aag aaa ttc ttt gtg 391
 Val Gln Arg Ser Glu Phe Lys Val Met Val Asn Lys Lys Phe Phe Val
 105 110 115

cag tac caa cac cgc gta ccc tac cac ctc gtg gac acc atc gct gtc 439
 Gln Tyr Gln His Arg Val Pro Tyr His Leu Val Asp Thr Ile Ala Val
 120 125 130 135

tcc ggc tgc ttg aag ctg tcc ttt atc acc ttc cag act cag aac ttt 487

Ser Gly Cys Leu Lys Leu Ser Phe Ile Thr Phe Gln Thr Gln Asn Phe

140

145

150

cgt cct gcc cac cag gca ccc atg gct caa act acc atc cat atg gtt 535

Arg Pro Ala His Gln Ala Pro Met Ala Gln Thr Thr Ile His Met Val

155

160

165

cac agc acc cct gga cag atg ttc tct act cct gga atc cct cct gtg 583

His Ser Thr Pro Gly Gln Met Phe Ser Thr Pro Gly Ile Pro Pro Val

170

175

180

gtg tac ccc acc cca gcc tat acc ata cct ttc tac acc ccc att cca 631

Val Tyr Pro Thr Pro Ala Tyr Thr Ile Pro Phe Tyr Thr Pro Ile Pro

185

190

195

aat ggg ctt tac ccg tcc aag tcc atc atg ata tca ggc aat gtc ttg 679

Asn Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Met Ile Ser Gly Asn Val Leu

200

205

210

215

cca gat gct acg agg ttc cat atc aac ctt cgc tgt gga ggt gac att 727

Pro Asp Ala Thr Arg Phe His Ile Asn Leu Arg Cys Gly Gly Asp Ile

220

225

230

gct ttc cac ctg aac ccc cgt ttc aat gag aat gct gtt gtc cga aac 775

Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe Asn Glu Asn Ala Val Val Arg Asn

235

240

245

act cag atc aac aac tcc tgg ggg cag gaa gag cga agt ctg ctt ggg 823

Thr Gln Ile Asn Asn Ser Trp Gly Gln Glu Glu Arg Ser Leu Leu Gly
 250 255 260

agg atg ccc ttc agt cga ggc cag agc ttc tcg gtg tgg atc ata tgt 871
 Arg Met Pro Phe Ser Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Ile Cys
 265 270 275

gaa ggt cac tgc ttc aag gta gct gtg aat ggt caa cac atg tgt gaa 919
 Glu Gly His Cys Phe Lys Val Ala Val Asn Gly Gln His Met Cys Glu
 280 285 290 295

tat tac cac cgc ctg aag aac ttg cag gat atc aac act cta gaa gtg 967
 Tyr Tyr His Arg Leu Lys Asn Leu Gln Asp Ile Asn Thr Leu Glu Val
 300 305 310

gcg ggt gat atc cag ctg acc cac gtg cag aca taggcaaggt ctctggccta 1020
 Ala Gly Asp Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr
 315 320

gggataaggg ctggagcact ctgccgtgtt cttatctttt cctgtctca gccctggcac 1080

catcagaaga gatcatcgct tataggaatt ccaggaaggt gaaattccca attgacitccc 1140

tccacaaagg gggttttcta ggctgtgtgg cacatgtgtt cagcccatag tctgagccat 1200

tgcccccaag ctagctatat actgagggaa gtgacctcc tgggtttgtt cagatctctg 1260

atcgttcccc cctcgtggc cctttttttt caccctcca ggagagccgc cctgatatca 1320

tcccactggc ctccaactga cccacaatgt ccacagtaac ttcccccat tctcaccag 1380

tatccataaa ataaagaaat aatatigctt gtctacac

1418

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, A61P13/12, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/42, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),
BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), JMEDICINE (JOIS),
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSUCHIYAMA, Y., et al., Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. Kidney Int. 2000, 58(5), pp.1941-1952, Full text, especially, abstract	1-8
X	WADA, J., et al., Galectins, Galactoside-Binding Mammalian Lectins : Clinical Application of Multi-Functional Proteins. Acta Med. Okayama. 2001, 55(1), pp.11-17, page 14, right column to page 15, right column; Table 2	1-8
X	Yoshinori TSUCHIYAMA et al., galectin-9 no Jin-en Yokusei Kouka no Kentou, Nichijinkai-shi, 1998, 40(3), p.147, Full text	1-8
X	Yoshinorui TSUCHIYAMA et al., galectin-9 no Jin-en Yokusei Kouka no Kentou (Dai 2 hou), Nichijinkai-shi, 1998, 41(3), p.337, Full text	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 November, 2001 (29.11.01)

Date of mailing of the international search report
11 December, 2001 (11.12.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09574

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/10490 A1 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 04 March, 1999 (04.03.99),	1
A	Claims; sequence table, page 45, line 15 to page 46, line 8; & JP 2001-522581 A & EP 1005548 A1 & AU 9887470 A	2-8
A	WO 92/07938 A1 (MALLUCCI, Livio), 14 May, 1992 (14.05.92), & JP 6-502302 A & EP 555286 A1 & US 6127169 A & GB 2249312 A & AU 9187565 A	1-6
A	YANG, R.-Y., et al., Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93, pp.6737-6742	1-6
A	WO 91/08290 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION), 13 June, 1991 (13.06.91) (Family: none)	1-6
A	WADA, J., et al., Developmental Regulation, Expression, and Apoptotic Potential of Galectin-9, a β -Galactoside Binding Protein. J. Clin. Invest. 1997, 99(10), pp.2452-2461	1-8
A	WADA, J., et al., Identification and Characterization of Galectin-9, a Novel β -Galactoside-binding Mammalian Lectin. J. Biol. Chem. 1997, 272(9), pp.6078-6086	1-8
L	WO 00/07624 A2 (TEIJIN LIMITED), 17 February, 2000 (17.02.00), & EP 1104307 A2 & AU 9950653 A (On the galectin-3, which is the active component in this application, it has been described in this document that its inhibitor is used for treatment or prevention of the identical disease.)	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09574

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 7 pertain to use of galectin-1, 3 or 9 for inhibiting nephritis, glomerular diseases and infiltration of leucocytes into glomeruli. On the other hand, the invention as set forth in claim 8 pertains to use of galectin-9 as an apoptosis inducer for CD8-positive cells.

Discussion on these claims indicates that the former group of inventions have a common technical feature of using galectin-1, 3 or 9 in treating renal diseases. However, use of the latter is not restricted to renal diseases and the function mechanism of the former is not newly presented therein, as will be discussed hereinafter. Thus, it cannot be recognized that the former and the latter have any technical feature in common.

Therefore, it cannot be recognized that there is any unity of invention among these inventions.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/09574

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹. A61K38/17, A61P13/12, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹. A61K38/00-38/42, A61P1/00-43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),
BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), JMEDICINE (JOIS),
WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	TSUCHIYAMA, Y., <i>et al.</i> Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. Kidney Int. 2000, 58(5), pp.1941-1952, 全文参照, 特に要旨	1-8
X	WADA, J., <i>et al.</i> Galectins, Galactoside-Binding Mammalian Lectins: Clinical Application of Multi-Functional Proteins. Acta Med. Okayama. 2001, 55(1), pp.11-17, 第14頁右欄-第15頁右欄, Table 2	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.11.01

国際調査報告の発送日

11.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	土山芳徳ら, galectin-9の腎炎抑制効果の検討, 日腎会誌, 1998, 40(3), p.147, 全文参照	1-8
X	土山芳徳ら, galectin-9の腎炎抑制効果の検討 (第2報), 日腎会誌, 1998, 41(3), p.337, 全文参照	1-8
X	WO 99/10490 A1 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 4. 3月. 1999 (04. 03. 99),	1
A	特許請求の範囲, 配列表, 第45頁15行-第46頁8行, & JP 2001-522581 A, & EP 1005548 A1, & AU 9887470 A	2-8
A	WO. 92/07938 A1 (MALLUCCI, Livio), 14. 5月. 1992 (14. 05. 92), & JP 6-502302 A, & EP 555286 A1, & US 6127169 A, & GB 2249312 A, & AU 9187565 A	1-6
A	YANG, R.-Y., <i>et al.</i> Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93, pp.6737-6742	1-6
A	WO 91/08290 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION), 13. 6月. 1991 (13. 06. 91) (ファミリーなし)	1-6
A	WADA, J., <i>et al.</i> Developmental Regulation, Expression, and Apoptotic Potential of Galectin-9, a β -Galactoside Binding Protein. J. Clin. Invest. 1997, 99(10), pp.2452-2461	1-8
A	WADA, J., <i>et al.</i> Identification and Characterization of Galectin-9, a Novel β -Galactoside-binding Mammalian Lectin. J. Biol. Chem. 1997, 272(9), pp.6078-6086	1-8
L	WO 00/07624 A2 (TEIJIN LIMITED) 17. 2月. 2000 (17. 02. 00) & EP 1104307 A2, & AU 9950653 A (本願発明における有効成分であるガレクチン-3に関し、本文献ではその阻害剤を同一疾患の治療又は予防のために用いることが記載されている。)	1-6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-7に係る発明は、ガレクチン-1、3又は9を腎炎、糸球体疾患、白血球の糸球体内浸潤抑制のために用いるものである。一方、請求の範囲8に係る発明は、ガレクチン-9をCD8陽性細胞のアポトーシス誘導剤として用いるものである。

ここで両者について検討するに、前者のものはいずれも腎臓疾患の治療にガレクチン-1、3又は9を用いる点で共通の技術的特徴を有するものと認められる。しかし、後者のものは腎臓疾患に限定して用いられるものではなく、また後述するように、前者の作用を奏するための機序を新たに示したものでもないから、結果として前者のものと後者のものとは共通の技術的特徴を有するものとは認められない。

よって、両者の間に発明の単一性があるものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)